



**HAL**  
open science

# Exploration des interactions au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* pour la découverte de nouveaux antifoulings éco-compatibles

Emilie Adouane

## ► To cite this version:

Emilie Adouane. Exploration des interactions au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* pour la découverte de nouveaux antifoulings éco-compatibles. Microbiologie et Parasitologie. Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN), 2023. Français. NNT: . tel-04608483

**HAL Id: tel-04608483**

**<https://hal.science/tel-04608483v1>**

Submitted on 11 Jun 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**  
Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2023

N°attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**

Spécialité : Ecologie microbienne, écologie chimique

Présentée et soutenue publiquement par

**Emilie Adouane**

Le 30 octobre 2023

---

**Exploration des interactions au sein de  
l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* pour la  
découverte de nouveaux antifoulings éco-compatibles**

---

Sous la direction de : **Mme Soizic Prado, Professeure et**

**M. Raphaël Lami, Maître de conférences**

**JURY :**

<b>Mme Soizic Prado</b>	<b>Professeure, Muséum National d'Histoire Naturelle</b>	<b>Directrice de Thèse</b>
<b>M. Raphaël Lami</b>	<b>Maître de conférences, Sorbonne Université</b>	<b>Co-directeur de Thèse</b>
<b>M. Samuel Bertrand</b>	<b>Maître de conférences, Université de Nantes</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Alexis Bazire</b>	<b>Professeur, Université Bretagne Sud</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme Claire Gachon</b>	<b>Professeure, Muséum National d'Histoire Naturelle</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme Véronique Eparvier</b>	<b>Directrice de recherche, Université Paris Saclay</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme Claire Hellio</b>	<b>Professeure, Université de Bretagne Occidentale</b>	<b>Examinatrice</b>



« Que de fois je me suis extasié en voyant la tranquillité de l'eau et la beauté du clair de lune.  
[...] On croirait qu'on respire à la fois le bien-être du corps et celui de l'âme. »  
Henri de Lacaze-Duthiers, Mahon 1853



# Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse, les rapporteurs Samuel Bertrand et Alexis Bazire, et les examinatrices Claire Gachon, Véronique Eparvier et Claire Hellio d'avoir accepté de passer du temps à évaluer mon travail.

Mes sincères remerciements à l'Institut de la Transition Environnementale de Sorbonne Université (SU-ITE) pour avoir financé ce projet et de m'avoir permis de faire cette thèse.

Un grand merci aux membres de mon comité de suivi individuel, Catherine Leblanc, Linda Kohl, Jean-François Briand, Laurent Evanno et Sébastien Duperron pour vos conseils et vos encouragements, mais aussi pour avoir passé du temps à relire mes « courts » comptes-rendus.

Je ne trouverai jamais les mots pour exprimer pleinement ma gratitude à ceux qui m'ont fait confiance et m'ont permis de concrétiser ce projet de thèse Soizic Prado et Raphaël Lami. Alors, merci ! Merci pour votre encadrement, vos conseils et votre aide tout au long de la thèse. Je vous remercie de m'avoir donné les moyens de travailler entre Paris et Banyuls dans les meilleures conditions et de m'avoir tant appris. Merci, pour votre complicité et votre enthousiasme pour chaque résultat même insignifiant. Merci d'avoir cru en moi quand même moi, je n'y croyais pas et merci d'avoir continué à me pousser à toujours aller plus loin. Entre l'enthousiasme et le dynamisme, de Soizic et la bienveillance et la confiance, de Raphaël, j'ai eu un encadrement exceptionnel.

J'aimerais remercier chaleureusement Cédric Hubas qui a été mon sauveur à de nombreuses reprises. Mes « tapisseries cubiques » - Soizic, juillet 2023, étaient artistiquement très intéressantes mais absolument illisibles. Ta capacité à traduire mes idées en langage R, est inestimable et m'impressionnera toujours. Alors merci pour ton temps, merci d'avoir autant de recul sur les données, merci pour tes conseils et merci pour ta patience.

Je voudrais également remercier chaleureusement Yves Desdevises, Directeur de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, qui a su me convaincre il y a six ans de rejoindre Banyuls. Ses conseils et sa vision professionnelle ont été précieux.

Je voudrais également remercier tous ceux qui ont accompagné ce travail de près ou de loin. Au MCAM, j'aimerais remercier Delphine et Séverine A pour votre soutien au laboratoire. Séverine, tu m'as appris à me servir d'une HPLC-prep et tu m'as fait confiance alors que l'appareil était neuf (et cher). Merci à toutes les deux pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre passion (Delphine des plantes). Je tiens à remercier infiniment pour leur aide, Remy et Arul de la plateforme de spectrométrie de masse du MNHN qui ont beaucoup été sollicités. Je remercie également Alain et Alexandre de la plateforme de RMN pour leur gestion des échantillons d'Adrien. Un grand merci à Adrien qui m'a aidé à isoler les composés de *Penicillium* et d'*Acremonium*.

À Banyuls, je voudrais remercier mes 3 incroyables stagiaires qui ont travaillé avec moi et qui ont trouvé beaucoup d'intérêts à mon sujet de thèse. Merci Emma de m'avoir aidé à conserver les souches et d'avoir déblayé le terrain pour tout (re-)mettre en place ! Merci à Camille M pour le travail incroyable effectué. Être avec toi au laboratoire c'est comme avoir toute une équipe de petites mains qui font tout et prévoient tout en avance. (Merci encore infiniment pour les boîtes surprises au -80°C qui m'ont fait économiser 2 mois de manips). Merci à Jeanne qui a effectué un travail formidable avec les nouveaux biotests et pour tous les bons et nombreux moments passés ensemble !

Je tiens à remercier Karine, Nyree, Charles-Hubert et tout particulièrement Laurent de la plateforme Bio2Mar pour m'avoir formée toutes ces années. Je voudrais également remercier Marcelino, Directeur d'Unité, de m'avoir accueilli et de m'avoir toujours fait me sentir comme un membre de l'équipe à part entière. Je voudrais aussi remercier l'équipe verrerie, Laurence et Josiane, pour leur temps passé à laver, autoclaver et calciner toute cette vaisselle et tous ces milieux de culture.

À Roscoff, je souhaite remercier Catherine, mais aussi Bertille, Sylvie et Simon de m'avoir chaleureusement accueilli en mission et de m'avoir fait une place dans votre laboratoire. Travailler avec vous a été un plaisir et mes séjours à Roscoff ont toujours été passionnants. Je suis rentrée de Roscoff grandit et sereine (bon ok une fois avec le covid).

En parlant de mission, un immense merci à Brice, Aïcha et Françoise d'avoir géré tous les ordres de missions et tout l'administratif. Merci d'avoir fait de votre mieux pour que les tracas administratifs empiètent le moins possible sur mon travail.

Je souhaite remercier l'ED227, merci à Nathalie, Jérôme, Julien et Tristan mais également tous les collègues représentants des doctorants avec qui j'ai pu passer du temps et échanger sur des sujets divers et variés. J'ai beaucoup appris et discuté avec vous et ça a toujours été un plaisir.

Pendant ces 3 ans, j'ai eu deux sacrées équipes de collègues et j'aimerais également les remercier. On repart au muséum, merci Brice et Christine de m'avoir convaincu de faire la pièce de théâtre avec vous (et de me coller une fausse moustache). Merci à la team du jeu de cartes, Bouchra, Séverine, Delphine, Brice, Christine, Laurence, Céline, Marie, Remy et Arul ! Bouchra, à cause de toi, j'ai un Skyjo à la maison et mes neveux me harcèlent pour jouer dès que je rentre. Merci également à Caroline, Stéphane, Didier, Kevin pour vos conversations si riches et divertissantes. Les pauses-café n'ont jamais été aussi enrichissantes. Merci à Yanyan, Adrienne et Séverine Z pour votre bonne humeur au quotidien. Merci à tous de m'avoir transmis votre passion.

Merci aux copains du MNHN ! Merci à Steffi, Benny et Mann, des collègues de bureau incroyables. Merci Gautier, d'avoir été mon binôme dès ton arrivée et de m'avoir tant aidé ! J'ai eu l'impression d'avoir une version chimiste de moi avec moi ! Un grand merci à toi Andrea d'avoir partagé mes galères MzMine ! Merci à Sophie, Robin, Jeanne, Amal, Lucas, Soheib, Arielle et Maurane, d'avoir été là même si finalement je n'ai pas passé beaucoup de temps avec vous. J'aurais voulu être là plus souvent !

Maintenant, on repasse côté LBBM, un immense merci à Cécile, je sais que tu ne le réalises pas, mais si tu n'étais pas là, on ne pourrait pas travailler. Merci également à Emeline et Eric d'avoir été des colocs de bureau aussi sympathiques ! Merci également à Carole d'avoir pris le relais quand j'ai commencé ma thèse. Je remercie toute la chouette équipe du LBBM avec qui j'ai beaucoup appris et grandi ces dernières années ! Je ne me lasse pas de travailler avec vous. Je souhaite également remercier chaleureusement Fanny et Mattea, d'avoir été des collègues joyeuses et dynamiques et d'être devenues au fil du temps des amies si chères. Mattea, tu resteras ma partenaire de laboratoire où que tu sois. (On va la monter cette start-up !). Camille, merci d'avoir été là pour cette dernière année et d'avoir pris doucement le relais. Merci pour ta jovialité, ta gentillesse et ta bienveillance. (Promis avant de partir je te montre toutes mes cachettes de matériels au labo).



« *On croise toujours les mêmes ici !* »

« *Psitt : Among us ?* »

Merci à vous, les copains de la pause, les copains tout court d'ailleurs ! Merci d'être toujours en pause mais jamais en même temps ! Merci à Judith, Léo, Amandin, Camille, Marc, David D, Laetitia, Louise, Océane, Anaël, Bastien, Florian, Loïc et Nico ! « Une rumeur raconte que si tu chuchotes 3 fois pétanque dans un couloir David apparaît ». Je souhaite remercier particulièrement Marc pour toutes ces pauses impausées, celles sérieuses et celles qui n'avaient aucun sens. Merci d'être toi et de me faire autant rire au quotidien.

« *C'est carré* »

Merci aux copaings ! Vous êtes nombreux, bruyants, un peu beaufs parfois, mais qu'est-ce que vous êtes adorables. Survivre sans vous tous à Banyuls aurait été très compliqué. Merci pour ces bons moments, ces fous rires, ces conversations et ces soirées ! Parce qu'envoyer un message de groupe en disant « soirée d'halloween ? », c'est prévoir entre 12 et 35 personnes alors merci pour ça ! Merci Fanny, Rafath, Leila, Louis, Louise, Lena, Adèle, Salomé, Milena, Emile, Max, le D, Chloé, Paul, Corentin, Milé, Bruna, Mathilde, Anaïs, Lisa, Totoche, Marc B, Stéphane, Claire et Victoria (et ceux déjà cités). Merci à tous d'avoir été là et de m'avoir soutenu du début à la fin et même dans les moments les plus durs. Bien évidemment merci à Figa (et à son équipe) d'être aussi souvent ouvert pour nous accueillir !

Je souhaite remercier les copains de Roscoff, qui m'ont toujours bien reçue. Grâce à votre bonne humeur et générosité, je me suis toujours sentie chez moi à Roscoff. Merci à Lisa, Yasmine, Louison, Sam et Jeremy de m'avoir embarqué au Typ puis à l'Albat après de longues journées de manips. Un remerciement spécial à Jeremy pour m'avoir dit aux journées d'insertion de l'ED que gratter des algues avec un filtre en verre ça pourrait peut-être marcher.

Je souhaite remercier tous les copains de plongée, le Rederis et Aquablue qui m'accueillent si souvent. Merci à Marie pour sa joie et son dynamisme et merci à tous les moniteurs avec qui j'ai passé le N1 et le N2. Un merci particulier à Léo qui me transmet sa passion et sa bonne humeur, merci d'avoir plongé dans le port et d'avoir récupéré du « gratta » de bateau pour la fête de la science. Merci à toi Zacharie, je te remercie d'avoir été là, si je plonge, c'est grâce à toi et si je termine cette thèse, c'est également un peu grâce à toi. Merci, aussi, aux copains de plongée de Villeneuve-le-Roi, cette année avec vous fut enrichissante et fascinante. Ce séjour à Estartit fut incroyable et m'a rempli de jolis souvenirs.

Je souhaite remercier les copains de « par-ci par-là » de longue date, merci à Raphaël G, Ambre, Robin, Marianne, Théotime, Loïc B, Océane, Thibaud, Chacha, Arthur et Antho. Merci de me soutenir quoi qu'il arrive, d'être là pour un ciné, une plage, un verre, juste un appel ou une soirée pyjama (tu te reconnaîtras).

Parfois, on rencontre des inconnus sur une plage, dans un bar, dans un couloir et on se rend compte que les années passent et qu'ils sont toujours là. Mille remerciements « aux inconnus devenus connus » ces 3 dernières années Shaïna, Coline, Lénaïc et Camille G. Vous avez débarqué dans ma vie comme des boulets de canon et depuis, je ne peux plus me passer de vous. D'ailleurs, Louise tu es apparue au tout début de ma thèse en tant que stagiaire de Soizic. Je t'ai croisé une fois sur le toit de l'hébergement à Banyuls. Maintenant, tu habites ici et je n'arrive plus à me séparer de toi. Merci d'avoir été là dans les meilleurs moments et les pires, merci pour ta gaieté, ton sens de l'humour, pour les plongées et les soirées ensemble. Ta partie de Zelda t'attend toujours chez moi d'ailleurs. Dans le même esprit, un immense merci à Louis. Je ne te remercierai jamais assez d'être là quand ça va, quand ça ne va pas et même, quand je ne sais pas si ça va. Merci de prendre soin de moi et de m'accompagner dans l'épreuve de la rédaction de thèse. Là tu es en train de lire en te disant « bon, tu as fini de mettre des plâtrées, tu as des papiers à écrire ». Merci aussi pour ça !

J'exprime ma plus grande gratitude envers mes parents et ma famille. Merci maman de m'appeler tous les jours pour savoir comment s'est passée ma journée. Merci Papa de m'avoir transmis ta passion pour le monde marin. Merci à Vincent, mon frère, de m'envoyer des idioties quotidiennes pour me faire rire et de m'acheter un sac pokémon pour mes 27 ans. Merci Elsa de toujours me proposer des sorties quand je suis là. Merci à mes deux merveilleux neveux pour leur joie de vivre et leurs bêtises qui me font beaucoup rire. Merci à tata Cricri pour tes longs appels de blabla sur tout et rien. Merci à vous 7 d'être là au quotidien, je ne vous remercierai jamais pour votre amour inconditionnel, votre présence, votre compréhension et votre sagesse. Merci aux autres membres de la famille d'être là (vous êtes très nombreux) pour ces moments passés ensemble.

*J'avais promis de m'arrêter à 5 pages... Mais si je vous ai oublié, je m'en excuse, envoyez-moi un message et on ira boire un verre.*



« Le bonheur que j'éprouve à étudier la nature pourra-t-il s'éteindre jamais ? Se pourrait-il qu'à un moment de mon existence, je puisse devenir indifférent aux merveilles qui déroulent devant nos yeux les êtres innombrables qui peuplent nos mers ? »  
Lacaze-Duthiers, Saint Jacut 1854



# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	3
<b>Tables des illustrations : Figures</b> .....	17
<b>Tables des illustrations : Tableaux</b> .....	21
<b>Liste des abréviations</b> .....	22
<b>Chapitre I. État de l'art</b> .....	25
1. L'importance de l'holobionte algal .....	27
A. Importance écologique et économique des macroalgues .....	27
B. Importance du microbiote dans la physiologie des macroalgues .....	31
B.1) Diversité microbienne au sein de l'holobionte algal .....	32
B.2) Rôle écologique du microbiote algal et importance de la médiation chimique .....	34
C. L'holobionte une source de molécules bioactives potentiellement valorisables .....	36
D. Les approches multi-omiques pour étudier l'holobionte algal .....	39
D.1) Les approches « omiques » .....	39
D.2) Approches -omiques chez l'holobionte algal .....	40
2. La lutte contre le biofouling : état des lieux et enjeux pour l'avenir .....	42
A. Le biofouling, ses conséquences économiques et écologiques .....	42
B. Les stratégies antifoulings et leurs limites .....	45
3. Intérêt des molécules antifouling qui ciblent les mécanismes clés dans la formation de biofilm. ....	47
A. Mécanismes impliqués dans la formation d'un biofilm .....	48
B. La diversité des mécanismes du QS dans les biofilms marins et les holobiontes .....	50
C. La diversité des mécanismes anti-QS dans les biofilms marins et les holobiontes .....	54
D. Limites des composés actuels et intérêts de rechercher de nouveaux composés .....	57
4. Stratégies de la thèse .....	58
A. Objectifs et questions de l'étude .....	58
B. Approches multi-omiques de la thèse .....	61
B.1) Metabarcoding .....	61
B.2) Métabolomique .....	63
<b>Chapitre II. Diversités microbiennes et métabolomes de surface de <i>S. latissima</i></b> .....	67
Avant-Propos .....	69
Article: Multi-Omics Analysis of the Microbiome and Metabolome of <i>Saccharina latissima</i> (Laminariales, Phaeophyceae) Surface. ....	71
Abstract .....	72

Introduction -----	73
Materials and Methods-----	74
Epimicrobiota sampling from <i>Saccharina latissima</i> -----	74
Extraction of total DNA from the algal epimicrobiota -----	75
Identification of the microbial communities by Illumina MiSeq-based high-throughput sequencing -----	75
Metabolites extraction and LC-MS analysis-----	77
Integration of the Surface Metabolome and Surface Microbiota Datasets: Multi-omics approach-----	78
Results -----	78
Bacterial diversity within the epimicrobiota of <i>S. latissima</i> -----	78
18SrRNA-based analysis of eukaryotic diversity within the epimicrobiota of <i>S. latissima</i> -	82
ITS-based analysis of the fungal diversity within the <i>S. latissima</i> epimicrobiota -----	83
Diversity of the metabolites expressed within <i>S. latissima</i> epimicrobiota-----	84
Multi-omics approach assess to interindividual variation within <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota. -----	86
Discussion-----	91
Diversity of the microbial communities colonizing the epimicrobiota of <i>Saccharina latissima</i> and their ecological roles -----	91
Surface metabolome of <i>S. latissima</i> -----	94
Interindividual correlation of the microbial diversity and surface metabolome. -----	96
<b>Chapitre III. Importance du quorum sensing dans la régulation de l'épimicrobiote de <i>S. latissima</i></b> -----	101
Avant-propos-----	103
Article: Effect of QS compounds on microbial communities within <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota (Laminariales, Phaeophyceae) -----	105
Introduction -----	106
Materials and methods-----	108
Selection of QS compounds concentrations -----	108
<i>In vitro</i> modification of algal epimicrobiota by QS compounds -----	108
Sampling of algal epimicrobiota -----	109
Extraction of total DNA from algal epimicrobiota -----	109
Nanopore MinION-based high-throughput sequencing -----	109
Extraction of metabolites and LC-MS-based Metabolomic Analysis -----	110
Integration of Surface Metabolome and Surface Microbiota Datasets: Multi-omics approach-----	111

Preliminary Results -----	112
Selection of QS compounds concentrations -----	112
Effect of QS compounds on bacterial diversity-----	112
Effect of QS compounds on fungal diversity-----	114
Effect of QS compounds on eucaryotic diversity -----	117
Effect of QS on <i>Saccharina latissima</i> surface metabolomes -----	119
Discussion-----	120
Diversity of the epimicrobiota of young <i>Saccharina latissima</i> sporophytes-----	120
Effect of QS compounds on communities-----	121
<b>Chapitre IV. Importance du quorum sensing dans les interactions du microbiote cultivable de <i>S. latissima</i></b> -----	125
Avant-Propos-----	127
Article: Importance of quorum sensing crosstalk in the brown alga <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota -----	129
Abstract -----	130
Introduction -----	131
Materials and methods -----	133
Sampling and isolation of epiphytic microbial strains -----	133
Taxonomic identification of bacterial and fungal epiphytic strains -----	134
Culture of strains-----	135
Fungal and bacterial supernatants-----	135
LC–MS-Based Metabolomic Analysis of fungal strains -----	136
Quorum sensing bioassay: detection of production and inhibition of AI-1 and AI-2 -----	137
Evaluation of bacterial biofilm-forming capacity -----	138
Biofilm inhibition-----	138
Results -----	139
Cultivable fungal and bacterial diversity from <i>S. latissima</i> epimicrobiota -----	139
Diversity of metabolites involved in microbial interactions produced by fungal strains isolated from the epimicrobiota of <i>S. latissima</i> -----	140
Production of QS chemical inhibitors by cultivable fungal strains of the algal epimicrobiota -----	143
Chemical mediators involved in QS produced by cultivable bacterial epimicrobiota -----	145
Ability to form and inhibit bacterial biofilm formation-----	147
Discussion-----	148
Cultivable diversity of the epimicrobiota of <i>Saccharina latissima</i> -----	148



Diversity of fungal chemical mediators -----	149
Role of the epimicrobiota in regulating bacterial biofilms -----	150
Brown algae epimicrobiota, a source of new bioactive and antifouling compounds ----	151
<b>Chapitre V. Isolement de composés anti-QS et antibiofilm isolés de souches fongiques de l'épimicrobiote de <i>S. latissima</i></b> -----	155
1. Introduction générale du chapitre -----	157
A. Contexte de l'étude -----	157
B. Sélection des souches -----	158
2. Matériels et méthodes -----	159
A. Isolement de composés Isolement et purification des composés par HPLC préparative -----	160
B. Analyses métabolomiques par LC-MS/MS -----	162
C. Caractérisation des composés actifs par RMN -----	163
D. Détection des activités anti-QS -----	163
E. Détection des activités antibiofilm -----	165
F. Traitements des résultats, analyses statistiques et représentations graphiques -----	165
3. Résultats -----	166
A. Métabolome de <i>Penicillium atramentosum</i> V2 isolée de l'algue brune <i>Saccharina latissima</i> -----	166
B. Fractionnement et bioguidage -----	170
C. Caractérisation des composés et fractions actives -----	171
4. Discussion -----	173
5. Conclusion du chapitre -----	174
<b>Chapitre VI. Discussion générale</b> -----	175
1. Les interactions microbiennes au sein de l'épimicrobiote de <i>Saccharina latissima</i> -----	178
A. Un core microbiote bactérien -----	178
B. Composition et rôle des communautés fongiques au sein de l'holobionte algal et leurs implications dans le métabolome de surface -----	180
C. Corrélations entre la structure et les traits fonctionnels des communautés microbiennes à la surface de <i>Saccharina latissima</i> -----	182
2. Importance du Quorum Sensing dans les interactions au sein de l'holobionte algal ----	184
A. Une grande diversité de composés impliqués dans les interactions microbiennes ----	185
B. Rôle des composés du QS dans les interactions de l'épimicrobiote algal -----	186
3. Recherches d'antifoulings potentiels au sein des métabolomes fongiques -----	188
Conclusion générale -----	191

<b>Annexe I : Méthodologies générales</b> .....	193
1. Échantillonnages d'épimicrobiote de <i>Saccharina latissima</i> .....	193
A. Pré Requis pour l'échantillonnage de l'épimicrobiote de <i>Saccharina latissima</i> .....	193
B. Méthodologie d'échantillonnage de l'épimicrobiote de <i>Saccharina latissima</i> .....	194
C. Mises en place des méthodes d'extractions des métabolomes de surface .....	196
D. Préparation des échantillons pour les analyses multi-omiques .....	198
2. Expérimentation <i>in vitro</i> sur jeunes sporophytes de <i>Saccharina latissima</i> .....	199
A. Mises en place de l'expérimentation .....	199
B. Culture des algues en conditions contrôlées en présence de composés impliqués dans le QS .....	200
C. Prélèvements au cours du temps .....	202
3. Études des microorganismes associés à l'épimicrobiote algal .....	203
A. Isollements et conservation des microorganismes .....	203
B. Tests biochimiques et souches rapportrices (biosenseurs) utilisés pour la détection des composés impliqués dans le QS .....	205
C. Cultures des microorganismes et mesure de formation de biofilm bactérien .....	207
D. Tests d'inhibition de formation de biofilm bactérien .....	208
4. Isolement des composés d'intérêts .....	209
A. Sélection des souches .....	209
B. Culture en grand volume des souches fongiques et analyses du métabolome .....	209
C. Fractionnement et purification des composés par HPLC préparative .....	210
D. Caractérisation des composés par RMN .....	211
<b>Annexes électroniques</b> .....	213
Annexes électroniques du Chapitre II .....	213
Annexes électroniques du chapitre III .....	215
Annexes électroniques du chapitre IV .....	216
Annexe électronique du chapitre V .....	218
<b>Annexes du Chapitre II.</b> .....	219
<b>Annexes du Chapitre III</b> .....	226
<b>Annexes du Chapitre IV</b> .....	233
<b>Annexes du Chapitre V</b> .....	237
<b>Valorisations scientifiques</b> .....	240
1. Articles .....	240
A. Articles soumis .....	240

B. Article en préparation -----	240
1. Liste des communications orales -----	240
2. Communications orales « Flash » -----	242
3. Communication par poster -----	242
4. Autres communications -----	242
5. Autres articles parus pendant la thèse -----	243
Poster: “Antibiofilm activities of fungal strains from the epimicrobiota of <i>Saccharina latissima</i> ” -----	244
<b>Références bibliographiques</b> -----	245

# Tables des illustrations : Figures

<b>Figure I.1</b> : Arbre schématique des eucaryotes montrant les positions phylogénétiques des lignées de macroalgues brunes, vertes et rouges. Issu de (Kloareg et al., 2021) adapté de Coelho and Cock, 2020. ....	28
<b>Figure I.2</b> : Forêt de varech près de Cortes Bank, Californie, Etats-Unis. Photographie de Brian Skerry, National Geographic Imagine Collection 2020. ....	29
<b>Figure I.3</b> : Culture d'algues brunes <i>Saccharina latissima</i> , dans l'estuaire de la Rance près de Saint Malo, France. Crédit : C-Weed Aquaculture 2021. ....	30
<b>Figure I.4</b> : Structure de la thallusine .....	34
<b>Figure I.5</b> : Schéma de la cascade « omiques » (inspiré de (Carriot, 2022)).....	39
<b>Figure I.6</b> : <i>Delisea pulchra</i> .....	41
<b>Figure I.7</b> : (1) Structure des furanones halogénées (2) Structure des AHLs .....	41
<b>Figure I.8</b> : Représentation schématique de la formation du biofouling marin .....	43
<b>Figure I.9</b> : Biofouling présent sur diverses structures immergées en mer. (A) Coque d'un bateau. (New Biofouling Regulations © Ministry for Primary Industries) (B) Structure aquacole Kiel Marine Farm (KMF) ( <a href="https://www.h2020united.eu/">https://www.h2020united.eu/</a> ) (C) Structure offshore en cours de nettoyage. (Seatrade Maritime News, <a href="https://mfame.guru/bio-fouling-ballast-water-barnacle-bill/">https://mfame.guru/bio-fouling-ballast-water-barnacle-bill/</a> ) (D) Epave d'un tractopelle immergé dans la baie de Banyuls-sur-Mer depuis 1983. Fanny Clergeaud, 2022 .....	44
<b>Figure I.10</b> : Exemples de surfaces microtopographiques (A) Photographie d'une feuille de lotus et de ses microstructures en microscopie électronique à balayage (MEB) (Li et al., 2019) (Elsevier © 2019). (B) Photographie d'un requin et des microstructures de sa peau en microscopie à balayage (MEB) (Wen et al., 2014) (Company of Biologists Ltd. © 2014). Issu de (Jin et al., 2022). ....	47
<b>Figure I.11</b> : Représentation schématique de la formation d'un biofilm chez un pathogène humain et diversité des mécanismes impliquée dans sa formation de biofilm (Upmanyu et al., 2022).....	49
<b>Figure I.12</b> : Représentation schématique des différents systèmes de QS chez <i>Vibrio sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> (Eickhoff and Bassler, 2018). ....	51
<b>Figure I.13</b> : Diversité des composés du QS bactérien et fongique. ....	52
<b>Figure I.14</b> : Diversité des composés de QQ et QSI produits par les organismes des trois domaines du vivants (bactéries, archées et eucaryotes) selon Grandclément et al., 2016. ....	55
<b>Figure I.15</b> : Nouvelles $\alpha$ -hydroxy $\gamma$ -butenolides extrait de la souche fongique endophyte <i>Paradendryphiella salina</i> isolée de macroalgues brunes (Vallet et al., 2020).....	56
<b>Figure I.16</b> : Impact des composés anti-QS sur le biofilm (Paluch et al., 2020) .....	57
<b>Figure I.17</b> : Plan schématique de l'organisation de la thèse.....	60
<b>Figure I.18</b> : Étapes du traitement des résultats de métabarcoding avec Qiime 2 .....	62
<b>Figure I.19</b> : Représentation schématique du workflow effectué sur les données de LC-MS/MS .....	65
<b>Figure II.1</b> : Microbial diversity within <i>S. latissima</i> epimicrobiota determined by Illumina MiSeq-based high-throughput sequencing. (A) Bacterial diversity at the Class level (B) Bacterial diversity at the Family level (C) Eukaryotic diversity at the Class level (D) Eukaryotic diversity at the Family level (E) Fungal diversity at the Class level (F) Fungal diversity at the Class level. Epimicrobiota 1-6: epimicrobiota samples from <i>S. latissima</i> 1-6; SW1-SW4: seawater samples. Unassigned sequences are not shown (see <b>Supp. Figure II.1</b> ) .....	80

<b>Figure II.2:</b> Heatmap of core microbiota within <i>S. latissima</i> epimicrobiota (A) Bacterial core microbiota at the Family level (B) Bacterial core microbiota at the Genus level (C) Eukaryotic core microbiota at the Family level (D) Eukaryotic core microbiota at the Genus level.....	81
<b>Figure II.3:</b> Metabolites within <i>S. latissima</i> epimicrobiota. Featured-Based Molecular Networking obtained on GNPS with parameters Min Pairs Cos=0.7 and Minimum Matched Fragment Ions=4 .....	85
<b>Figure II.4:</b> Abundance and prevalence of metabolites within <i>S. latissima</i> epimicrobiota. *: compounds with a MS/MS spectra. ....	86
<b>Figure II.5:</b> Multiple Factor Analysis (MFA) result: axis representation. (A) Contribution of each group to Dimension 1 (B) Contribution of each group to Dimension 2 (C) Partial axes plot colored by group .....	88
<b>Figure II.6:</b> Multiple Factor Analysis (MFA) result: group of variables in each individual epimicrobiota (1-6) (A) Individuals plot factor map (B) Plot of quantitative variables colored by cos2.....	90
<b>Figure III.1:</b> Bacterial diversity at Class and Family level within <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). ....	113
<b>Figure III.2:</b> Fungal diversity at the Class and Family level within <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). ....	116
<b>Figure III.3 :</b> Eukaryotic diversity at the Class and Order level within <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit) .....	118
<b>Figure III.4 :</b> Molecular network (FBMN) of <i>Saccharina latissima</i> surface metabolomes without annotation. Legend: green - Control EtOH, blue - C10-HSL, orange - Furanone C30 .....	119
<b>Figure IV.1:</b> Fungal and bacterial cultivable diversity from the epimicrobiota of <i>S. latissima</i> . ....	140
<b>Figure IV.2:</b> Metabolites putatively involved in microbial interactions produced by fungal strains isolated from the <i>S. latissima</i> epimicrobiota. Molecular subnetworks obtained after extraction of 100 metabolites potentially involved in interactions between microorganisms. The complete network containing 573 metabolites is shown in <b>Supp Figure IV.1</b> and annotations are shown in <b>Supp Tables IV.3A and 3B</b> . ....	142
<b>Figure IV.3:</b> Bioactivities of fungal strains in MEA and PDB media. Phylogenetic tree of fungal strains and biotest results for each strain in MEA and PDA culture media. The numbers on the branches correspond to the genetic distance between strains.....	144
<b>Figure IV.4:</b> Bioactivities of bacterial strains in MB media. Phylogenetic tree of bacterial strains and biotest results for each strain in MB culture medium. The numbers on the branches correspond to the genetic distance between strains.....	146
<b>Figure V.1:</b> Culture de 3L de <i>Penicillium atramentosum</i> V2 en milieu liquide MEA/NSW	159
<b>Figure V.2:</b> Interface de la puriflash® lors de l'élaboration des différentes fractions. Uniquement les voies C (water) et D (acétonitrile) ont été utilisées lors de l'élaboration du gradient de solvant permettant l'élution de l'extrait .....	160
<b>Figure V.3 :</b> Spectre de LC-MS/MS de <i>Penicillium atramentosum</i> V2.....	167
<b>Figure V.4:</b> Réseau moléculaire (FBMN) du métabolome de <i>Penicillium atramentosum</i> V2 avec les classes moléculaires putatives des métabolites présents .....	168
<b>Figure V.5:</b> Annotations putatives des métabolites de <i>Penicillium atramentosum</i> V2.....	169

<b>Figure V.6:</b> Structure des andrastines isolées.....	172
<b>Figure A1.1 :</b> Méthodologie de l'échantillonnage 1 de l'épimicrobiote de <i>Saccharina latissima</i> (janvier 2021) .....	195
<b>Figure A1.2 :</b> Spectre de LC-MS des échantillons du métabolome de surface de <i>Saccharina latissima</i> contaminé par les composés présents dans les écouvillons. ....	196
<b>Figure A1.3:</b> Méthodologie de l'échantillonnage 2 de l'épimicrobiote de <i>Saccharina latissima</i> (juin 2021).....	198
<b>Figure A1.4:</b> Test de concentrations des composés du QS ajouté aux cultures de sporophytes(A) Exposition des sporophytes aux différents composés du QS (B) Résultats des mesures de photosynthèses au cours du temps. (FC30 correspond à la Furanone C30).....	200
<b>Figure A1.5 :</b> Culture des sporophytes (A) Culture mère (B) Tri des sporophytes avant exposition aux composés impliqués dans le QS.....	201
<b>Figure A1.6:</b> Exposition in vitro des sporophytes de <i>Saccharina latissima</i> à des composés impliqués dans le QS.....	201
<b>Figure A1.7:</b> Prélèvement au cours du temps de sporophytes de <i>Saccharina latissima</i> (A) Organisation de la paillasse (B) Zoom sur les sporophytes (C) Sporophytes au cours des prélèvements. Légende : (1) Bouteille de culture en condition contrôlée (2) Sporophytes (3) Filtres en fibre de verre .....	203
<b>Figure A1.8:</b> Photo de quelques souches bactériennes et fongiques isolées de l'épimicrobiote de <i>Saccharina latissima</i> . ....	205
<b>Figure A1.9:</b> Culture de 3L de <i>Penicillium atramentosum</i> V2 (A) et <i>Acremonium fuci</i> A4 (B).....	210
<b>Supp. Figure II.1:</b> Methods for sampling the epimicrobiota of <i>Saccharina latissima</i> .....	219
<b>Supp. Figure II.2:</b> Microbial diversity at the Family level with unassigned sequences in the epimicrobiota of <i>S. latissima</i> determined by Illumina MiSeq-based high-throughput sequencing. (A) Bacterial diversity (RNAr 16S gene) (B) Eukaryotic diversity (RNAr 18S gene) (C) Fungi diversity (ITS2 gene). Epimicrobiota 1-6: epimicrobiota samples from <i>S. latissima</i> 1-6; SW1-SW4: seawater samples. (Le panel C a été déplacé par rapport à la figure d'origine).....	220
<b>Supp. Figure II.3:</b> Microbial diversity at the Genus level without unassigned sequences within the epimicrobiota of <i>S. latissima</i> . (A) Bacterial diversity (RNAr 16S gene) (B) Eukaryotic diversity (RNAr 18S gene) (C) Fungi diversity (ITS2 gene). Epimicrobiota 1-6: epimicrobiota samples from <i>S. latissima</i> 1-6; SW1-SW4: seawater samples. (Panel C déplacé par rapport à la figure d'origine de l'article).....	221
<b>Supp. Figure II.4:</b> Alpha diversity index of Bacterial (A), Eukaryotic diversity (B) and Fungi Diversity (C) (Mann-Whitney test, GraphPad Prism 9.5.1).....	222
<b>Supp. Figure II.5:</b> Molecular network from FBMN without annotation.....	223
<b>Supp. Figure II.6:</b> MFA construction dimension (A) Groups representation (B) Partial axes plot colored by group. ....	224
<b>Supp. Figure II.7:</b> Contribution of top 150 quantitative variables to dimension (A) Dim-1 (B) Dim-2 .....	225
<b>Supp. Figure III.1:</b> Testing the concentrations of QS compounds added to sporophyte cultures(A) Exposure of sporophytes to different QS compounds (B) Results of photosynthesis measurements over time (Fur corresponds to Furanone C30).....	227
<b>Supp. Figure III.2:</b> Bacterial diversity at Family and Genus level within <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). ....	228
<b>Supp. Figure III.3:</b> Alpha diversity index of Bacterial, Eukaryotic diversity and Fungi Diversity (Kruskal Wallis's tests, GraphPad Prism 9.5.1). ....	229

<b>Supp. Figure III.4</b> : Fungal diversity at Class and Family level within <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota exposed to QS compounds over time with Laminariales sequences. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). (rRNA 16S dataset). .....	230
<b>Supp. Figure III.5</b> : Fungal diversity at Order and Genus level within <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). (ITS fragment dataset). .....	231
<b>Supp. Figure III.6</b> : Eukaryotic diversity at Class and Genus level within <i>Saccharina latissima</i> epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). (rRNA 18S dataset). .....	232
<b>Supp. Figure V.1</b> : <sup>1</sup> H RMN de l'andrastine A.....	237
<b>Supp. Figure V.2</b> : <sup>1</sup> H RMN de l'andrastine B .....	238
<b>Supp. Figure V.3</b> : <sup>1</sup> H RMN de l'andrastine C .....	238
<b>Supp. Figure V.4</b> : <sup>1</sup> H RMN de la fraction bioactive F7-6.....	239

## Tables des illustrations : Tableaux

---

<b>Tableau V.1:</b> Poids des fractions après purification en phase inverse .....	161
<b>Tableau V.2:</b> Poids des fractions après purification de la fraction 7 .....	161
<b>Tableau V.3:</b> Poids des fractions après purification de la fraction 10 .....	162
<b>Tableau V.4 :</b> Activités d'inhibition de la formation de biofilm et des mécanismes du QS de de l'extrait et des fractions à 100 µg/ml. « + » pour significativement bioactif » et « - » non significatif.....	171
<b>Tableau A1.1:</b> Méthodes d'extraction des métabolomes de surface de <i>Saccharina latissima</i> .....	197
<b>Tableau A1.2:</b> Récapitulatif des biosenseurs utilisées pour détecter les composés impliqués dans les mécanismes du QS .....	206
<b>Supp. Tableau III.1 :</b> Primers used for sequencing.....	227



# Liste des abréviations

---

3-oxo-C10-HSL: *N*-3-oxodecanoyl-L-homoserine lactone

ACP / PCA: Analyse en composantes principales / Principal Component Analysis

AFM / MFA: Analyse Factorielle Multiple / Multiple Factor Analysis

AHL / HSL: *N*-acyl homoserine lactone / homoserine lactone

AI-1: autoinducer 1

AI-2: autoinducer 2

Anti-QS : anti quorum sensing

ASV: Amplicon Sequence Variant

C6-HSL: *N*-hexanoyl-L-Homoserine lactone

C10-HSL: *N*-decanoyl-L-Homoserine lactone

CAI: cholerae autoinducer

c-di-GMP : guanosine dimère bis-(3'-5')-cyclique

DMSO: dimethylsulfoxide

DMSP: diméthylsulfoniopropionate

DNA / ADN: deoxyribonucleic acid / acide désoxyribonucléique

DO / OD: densité optique / optic density

DPD: 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires

FRC: Fouling Release Coating

HPLC: high performance liquid chromatography

ITS: internal transcribed spacer

K2: Kimura 2-parameter

LC-MS/MS: Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

MA / MB: Marine agar, Marine broth

MEA: malt extract agar

MeOH: Méthanol

MS: mass spectrometry

NSW: natural seawater

PBS: phosphate-buffered saline

PDA - PDB: Potato Dextrose Agar / Potato Dextrose Broth

PCR: polymerase chain reaction

QC: quality control

QS: quorum sensing

QSI: quorum sensing inhibitor (inhibition du récepteur du QS)

QSM: quorum sensing mechanisms (quorum sensing fongique)

QQ: quorum quenching (inhibition par des enzymes)

RMN / NMR: resonance magnétique nucléaire

RNA / ARN: ribonucleic acid / acide ribonucleic

SW: seawater

TBT: tributylétain



## Chapitre I. État de l'art





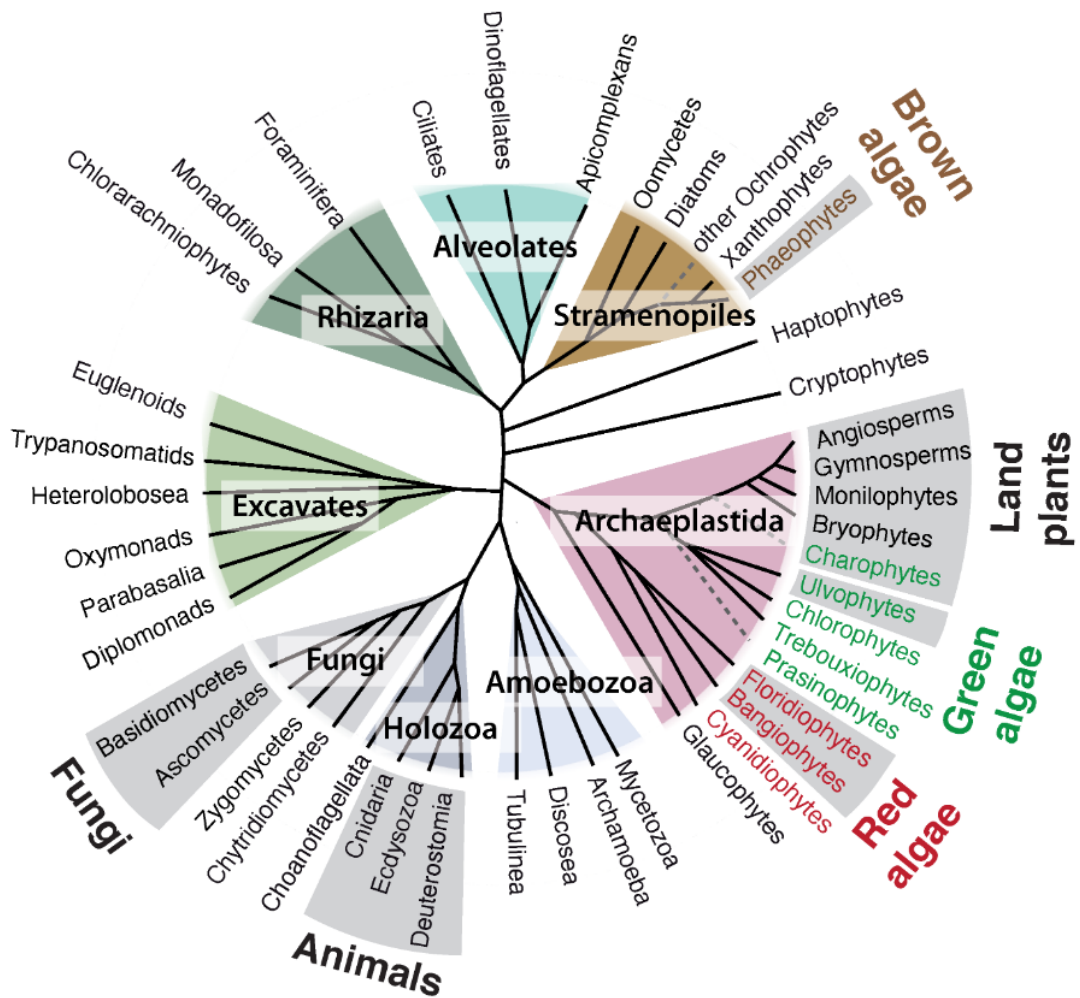
# 1. L'importance de l'holobionte algal

## A. Importance écologique et économique des macroalgues

Les macroalgues sont des eucaryotes photosynthétiques multicellulaires sessiles fréquemment rencontrées dans les eaux polaires, tempérées et tropicales. Elles se différencient des plantes par leur absence de tissus spécialisés comme des feuilles, de système vasculaire et racinaire (Graham et al., 1991).

Le terme macroalgue inclut les algues vertes, algues rouges et algues brunes. Il regroupe trois lignées polyphylétiques appartenant à deux super-groupes des eucaryotes : les Archaeplastida (algues rouges (Rhodophyta) et vertes (Glaucophyta)) et les Stramenopila (algues brunes (Phaeophyceae))(Figure I.1)(Cock and Collén, 2015; Coelho and Cock, 2020). Les archives fossiles de macroalgues remontent à plus de 1200 millions d'années et sont donc antérieures à l'apparition des plantes terrestres. L'algue rouge *Bangiomorpha* sp. représente le plus ancien organisme multicellulaire résolu taxonomiquement (Butterfield, 2000). Les algues brunes, vertes et rouges présentent des différences en termes de pigmentation, d'habitat, de morphologie et d'application. Chacun de ces groupes joue un rôle important dans les écosystèmes marins et peut avoir des applications industrielles et alimentaires.

Au cours de cette étude, nous allons nous focaliser sur les algues brunes qui forment une famille phylogénétiquement distante des autres familles eucaryotes (Bartsch et al., 2013; Bolton, 2010) avec pour modèle d'étude *Saccharina latissima*, anciennement *Laminaria saccharina* (Laminariales, Phaeophyceae). Cette macroalgue répandue sur nos côtes appartient aux laminaires et peuple les substrats rocheux des régions côtières (entre 1 et 100m de profondeur) (Bold and Wynne, 1985). Les laminaires sont des organismes essentiels au fonctionnement des écosystèmes marins et forment de denses forêts de varech (ou « kelp » en anglais)(Dayton, 1985). Le terme « forêt de varech » désignait à l'origine les forêts de laminaires mais ce terme a peu à peu été étendu aux autres macroalgues brunes formant des canopées comme les Fucales, les Tilopteridales et les Desmarestiales (Fraser, 2012). Ici, le terme *forêt de varech* sera utilisé pour désigner les canopées formées par les algues brunes.



**Figure I.1 :** Arbre schématique des eucaryotes montrant les positions phylogénétiques des lignées de macroalgues brunes, vertes et rouges. Issu de (Kloareg et al., 2021) adapté de Coelho and Cock, 2020.

Producteur primaire majeur, les forêts de varech fournissent abris, nourriture et habitats pour de nombreux macro et micro-organismes (mammifères, oiseaux, poissons et invertébrés) (Bertocci et al., 2015; Norderhaug et al., 2005; Reisewitz et al., 2006; Schiel and Foster, 2015, 2006). Leur rôle écologique est d'autant plus essentiel qu'elles ont un fort potentiel de séquestration du carbone (Duggins and Eckman, 1997; Smale et al., 2016). Ainsi, cette biomasse va pouvoir être exportée en petite quantité lors des tempêtes vers d'autres écosystèmes comme les grands fonds marins et les rivages rocheux intertidaux (Duggins et al., 1989; Krumhansl and Scheibling, 2012). Les forêts de varech comptent parmi les écosystèmes les plus diversifiés et les plus productifs du monde et leur présence est signe de bonne santé des écosystèmes (Chung et al., 2013; Leclerc et al., 2013; Mann, 1973)(**Figure I.2**). Au sein de ces canopées, les Laminaires (Phaeophyceae, Laminariales) jouent un rôle crucial en produisant l'essentiel de la biomasse photoautotrophe de ces écosystèmes (Bartsch et al.,

2013; Christie et al., 2003; Lorentsen et al., 2010; Schultze et al., 1990). Elles participent également à l'amélioration de la qualité de l'eau, la stabilisation des sédiments (diminution de l'érosion, de la turbidité et de la re suspension), et diminuent l'énergie des vagues ainsi que la vitesse des courants en zone côtière (Madsen et al., 2001; Mork, 1996).



**Figure I.2** : Forêt de varech près de Cortes Bank, Californie, Etats-Unis. Photographie de Brian Skerry, National Geographic Imagine Collection 2020.

De par leur grande taille, leur composition et leur croissance rapide, les macroalgues font l'objet d'intérêts industriels importants. Connaissant une expansion notable, ces dernières années, l'industrie mondiale des algues était estimée à 16,7 milliards de dollars américain en 2020 et devrait atteindre les 30,2 milliards de dollars d'ici 2025. La quantité globale de macroalgues récoltées annuellement est passée de 13,4 millions de tonnes en 2005 à 35,7 millions de tonnes en 2020 et 97,4% des cultures sont situées en Asie (FAO, 2020).

Certaines macroalgues, dont les Laminaires, sont notamment utilisées dans le domaine alimentaire et certaines espèces de *Saccharina latissima* (**Figure I.3**) ont été introduites dans certaines régions uniquement pour la consommation humaine (Suzuki et al., 2007). Elles contiennent de nombreux minéraux, de l'iode, des vitamines et des sucres et sont ainsi utilisées pour l'alimentation animale en complément alimentaire ou en poudre (mammifères, poissons, humains) (McHugh, 2003; Schmid et al., 2003). Leur taux élevé de matière organique peut également servir comme bio-engrais, enrichissant les sols en éléments nutritifs et améliorant la croissance et la productivité des plantes (Soares et al., 2020). La quantité de



sucres (alginates, agars, carraghénanes) contenue dans les macroalgues est importante, elles sont donc une source de gélifiants et d'émulsifiants pour l'industrie alimentaire et cosmétique (Gomes et al., 2022; Mohammed et al., 2020; Peteiro, 2018). Source précieuse d'énergie et de biocarburants, les macroalgues brunes, notamment *Saccharina latissima*, entraînent un fort dégagement de chaleur et de gaz permettant de produire de l'énergie, du biométhane et du bioéthanol (Adams et al., 2009; Milledge et al., 2014; Sasaki and Yoshikuni, 2022; Sharmila et al., 2021; Vivekanand et al., 2012; D. Wang et al., 2016). Comme d'autres macroalgues, *Saccharina latissima* peut également être employée à des fins de bioremédiation, en limitant, par leur présence, l'eutrophisation dans des fermes de pisciculture (Handå et al., 2013; Roussel et al., 2019; Sanderson et al., 2012). Les extraits de macroalgues sont également une source de composés antibiotiques, antiviraux, antifongiques et antitumoraux (Mayer and Hamann, 2005; Priyanka et al., 2022; Smit, 2004).



**Figure I.3** : Culture d'algues brunes *Saccharina latissima*, dans l'estuaire de la Rance près de Saint Malo, France. Crédit : C-Weed Aquaculture 2021.

Depuis quelques années, à cause de la surpêche et des changements climatiques, les forêts de varech sont en déclin (Araújo et al., 2016; Fernández, 2011; Steneck et al., 2002; Wernberg et al., 2010). Le réchauffement climatique entraîne un stress physiologique sur les algues et les modélisations prédisent que les laminaires vont progresser vers les zones froides tempérées et polaires, plus adaptées à leur physiologie (Assis et al., 2009; Müller et al., 2009; Oppliger et al., 2012; Raybaud et al., 2013). D'autres facteurs ont entraîné ce déclin, comme

la pollution de l'eau (Airoldi et al., 2008; Connell, 2007; Delebecq et al., 2013; Strain et al., 2014), l'apparition de maladies et d'espèces herbivores non indigènes envahissantes (Araújo et al., 2016; Ellertsdóttir and Peters, 1997; Williams and Smith, 2007).

Les maladies touchent en partie les cultures de macroalgues (W. Wang et al., 2021) et causent des dommages économiques importants (Gachon et al., 2010). Le contrôle des maladies est devenu l'opération la plus coûteuse en culture d'algues (Kim et al., 2014). Les communautés bactériennes alginolytiques décomposant l'alginate des macroalgues sont les pathogènes les plus communs. Ces bactéries naturellement présentes sur le varech sain peuvent devenir pathogènes sous certaines conditions environnementales comme l'élévation de la température (Peng and Li, 2013; W. Wang et al., 2021). Ainsi, l'augmentation de la température entraîne une dysbiose, c'est-à-dire une perte de symbiotes mutualistes, qui laisseront place à des pathogènes engendrant un déséquilibre du microbiome. Ce dernier peut impacter négativement l'état physiologique de l'hôte pouvant aboutir à sa mort (Egan and Gardiner, 2016; Minich et al., 2018). L'étude de la biologie et du fonctionnement des interactions entre macroalgues et microbiome associé constitue donc un point clé pour la sauvegarde des populations naturelles et pour l'algoculture industrielle.

## **B. Importance du microbiote dans la physiologie des macroalgues**

Les macroalgues entretiennent d'étroites interactions avec les communautés microbiennes qui les colonisent (bactéries, champignons, virus et archées). Défini sous le terme d'holobionte, l'hôte algal et son microbiome constitue un écosystème complexe (Margulis, 1990; Margulis and Fester, 1991; Theis et al., 2016). Ces microorganismes jouent un rôle crucial dans la santé et le fonctionnement de l'hôte. Derrière le concept d'holobionte repose l'idée que la survie de l'organisme ne dépend pas que de son environnement et de ses gènes mais également des interactions complexes qu'il entretient avec les microorganismes associés. Cette idée élargit le concept d'évolution à une échelle de micro-écosystème, c'est-à-dire l'algue, son environnement et son microbiome. Le dernier est défini comme la collection de tous les organismes qui forment le microbiote et leurs génomes associés. Le concept d'holobionte soulève l'importance d'étudier les organismes et leur microbiome de manière conjointe (Bordenstein and Theis, 2015; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2018;

Theis et al., 2016). Ainsi, chacun de ces organismes constitue une niche écologique pouvant héberger une communauté microbienne particulière. Les microorganismes de surface, les épiphytes, forment l'épimicrobiote algal et les microorganismes internes, les endophytes, constituent l'endomicrobiote. Notre étude se concentre sur l'épimicrobiote algal, qui est défini comme une « seconde peau », c'est-à-dire un biofilm complexe avec une forte densité cellulaire mais également d'une communication chimique intense et pluridirectionnelle entre les microorganismes (Wahl et al., 2012).

La majeure partie des connaissances dont nous disposons actuellement sur les microbiotes et leur rôle pour l'hôte concerne les microbiotes terrestres et animaux (mammifères et surtout humains). Dans le monde marin, le modèle prédominant pour ces études est le corail dont les communautés microbiennes et leur rôle fonctionnel ont été particulièrement bien décrits (Boilard et al., 2020; Bourne et al., 2009; Leggat et al., 2007; Thompson et al., 2015).

### **B.1) Diversité microbienne au sein de l'holobionte algal**

L'holobionte algal est constitué de bactéries, qui sont les communautés les plus abondantes, mais également de champignons, d'archées et d'eucaryotes unicellulaires (diatomées, dinoflagellés)(Egan et al., 2013; Hollants et al., 2013). Dans les années 1970, des études culture-dépendantes ont mis en évidence une différence de composition bactérienne entre l'eau de mer et les macroalgues environnantes. Cette différence a également été observée entre différentes macroalgues rouges, vertes et brunes mais aussi entre macroalgues brunes d'espèces différentes (Bolinches et al., 1988; Cundell et al., 1977; Egan et al., 2013). Par exemple, chez les algues brunes, les bactéries appartenant aux phyla des Planctomycetes et Verrucomicrobia sont abondantes sur le varech norvégien des *Laminaria hyperborea* et des *Fucus vesiculosus* de mer Baltique (Lachnit et al., 2011), mais absentes chez des *Saccharina latissima* (Laminariales) de la mer Baltique et de la mer du Nord (Burgunter-Delamare, 2022; Staufenberger et al., 2008). Cette diversité bactérienne varie en fonction de la zone de l'algue (apex, crampon, lame) mais également en fonction de la saison et de la région géographique (Burgunter-Delamare, 2022; Corre and Prieur, 1990; Ihua et al., 2020; Lemay et al., 2021; Wahl et al., 2012).

La diversité fongique de l'holobionte algal n'a été que peu explorée jusqu'à présent et concerne principalement celle des endophytes. Ce manque de données concernant les épiphytes est expliqué par le fait que peu d'études séparent les endophytes, des épiphytes. Cependant, la diversité endophytique fongique a été décrite par des approches culturales (en majorité) et moléculaires chez les macroalgues vertes, rouges et brunes d'Antarctique, d'Atlantique du Nord (Debbab et al., 2012; Flewelling et al., 2013b; Furbino et al., 2014; Godinho et al., 2013; Harvey and Goff, 2010; Loque et al., 2010; Suryanarayanan, 2012; Tourneroché et al., 2020). La diversité épiphytologique fongique des macroalgues décrite par Chen et al. en 2022 par métabarcoding, a révélé la prédominance d'Ascomycota (environ 20%), de Chytridiomycota (environ 10%) puis de Basidiomycota (environ 5%) au sein des épimicrobiotes d'algues vertes, rouges et brunes en Chine. Chez les algues brunes, les genres présents étaient majoritairement des taxons inconnus ainsi que des *Aspergillus sp.*, *Cutaneotrichosporon sp.* et *Alternaria sp.* (Chen et al., 2022). En effet, les études de diversité fongique épiphyte par métabarcoding sont encore rares, la plupart reposant sur des approches culture-dépendantes. Par exemple, il a été mis en évidence à la surface de macroalgues rouges et brunes de Mer Rouge et d'Atlantique, des *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Eurotium sp.*, et *Fusarium sp.* (Abdel-Gawad et al., 2014; Zuccaro et al., 2008). Cette diversité fongique épiphytologique et endophytologique varie également, comme les bactéries, en fonction des macroalgues, des saisons et des régions géographiques (Abdel-Gawad et al., 2014; Suryanarayanan, 2012; Tourneroché et al., 2020; Zuccaro et al., 2008).

Les communautés archées ont été très peu étudiées chez les macroalgues, mais leur présence a été mise en évidence chez des algues rouges, vertes et brunes (dont *Saccharina latissima*) (Lu et al., 2023). Leur diversité et leur rôle au sein de l'holobionte n'ont pas été explorés. Cependant, les archées pourraient participer à la fitness des macroalgues en dégradant le diméthylsulfoniopropionate (DMSP) et ses dérivés, produits comme mécanismes de défense (Burgunter-Delamare, 2022; Taylor and Visscher, 1996; Van Alstyne et al., 2001; Van Alstyne and Puglisi, 2007). Le microbiote algal est également composé d'autres organismes comme des petites algues filamenteuses (Chlorophyta, Phaeophyceae, Rhodophyta) habitant principalement les espaces intercellulaires de leur hôte (Cundell et al., 1977; Potin, 2012), mais aussi de levures (Uchida and Murata, 2004), de diatomées (Cundell et al., 1977) et de protistes hétérotrophes (Armstrong et al., 2000).

Les virus qui sont les organismes les plus abondants dans le monde marin sont également présents à la surface des macroalgues (Schroeder and Mckeown, 2021; Suttle, 2007, 2005). Ainsi, les *Phaeovirus* sp. peuvent insérer leurs génomes dans ceux des algues brunes comme les *Ectocarpus* sp., *Laminaria* sp. et *Saccharina* sp. (Phaeophyceae) et causent parfois des infections (McKeown et al., 2018, 2017).

## B.2) Rôle écologique du microbiote algal et importance de la médiation chimique

L'importance du microbiome chez les macroalgues a été mise en évidence pour la première fois chez l'algue verte *Ulva lactuca*. En condition de culture axénique (absence de communauté bactérienne), une morphologie anormale est observée qui peut être restaurée par l'inoculation de bactéries (Provasoli and Pintner, 1980). Depuis, il a été montré que la croissance et la morphogénèse d'*Ulva* sp. pouvaient être rétablie par l'ajout de bactéries de la famille des Rhodobacteraceae et Flavobacteriaceae, produisant de la thallusine (Figure I.4) et d'autres phytohormones cytokiniques essentielles (Alsufyani et al., 2020; Spoerner et al., 2012).

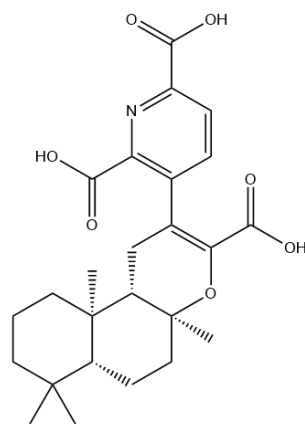


Figure I.4 : Structure de la thallusine

L'importance du microbiote bactérien pour la physiologie de l'algue hôte a pu être observée chez d'autres macroalgues notamment chez les macroalgues vertes (Nakanishi et al., 1999; Singh et al., 2011; Wichard, 2023) mais également chez des algues brunes comme *Ectocarpus* sp. (Burgunter-Delamare et al., 2021; Tapia et al., 2016). Ainsi, le microbiome apporte des composés nécessaires à la croissance de l'algue tels que l'iode, des cytokinines ou de la vitamine B12 chez les algues brunes (Pedersen, 1973; Pedersén, 1969, 1968). De plus, il a été démontré que les bactéries associées aux macroalgues influencent la libération et la

fixation des spores d'algues (Joint et al., 2007; Potin, 2012; Weinberger, 2007) et favorisent ou bloquent la fixation des larves d'invertébrés (Dobretsov and Qian, 2002; Steinberg and De Nys, 2002). Lors du phénomène de dysbiose, l'introduction de nouvelles souches bactériennes peut également permettre de restaurer l'état physique de l'algue en participant aux fonctions métaboliques manquantes causées par la perturbation du microbiote (Burgunter-Delamare et al., 2020; Saha and Weinberger, 2019). En réponse à cette dysbiose, l'hôte peut également mettre en place des stratégies de restauration. Chez l'algue rouge *Delisea pulchra*, lors d'une perturbation microbienne, la communauté se modifie par des processus cycliques de successions bactériennes jusqu'à restaurer la communauté de départ. Les premières bactéries colonisatrices protègent l'hôte des agents pathogènes putatifs qui sont susceptibles de coloniser l'algue aux étapes précoces de succession. L'algue se défend chimiquement avec des furanones halogénées qui exercent une fonction sélective importante sur le microbiome et inhibent les potentiels pathogènes (Longford et al., 2019) (voir encadré *Delisea pulchra*).

Chez l'algue brune *Taonia atomaria*, des composés tels que des diacylglycerylhydroxymethyl-N,N,N-triméthyl- $\beta$ -alanines (DGTAs), des sesquiterpènes, des caroténoïdes et le DMSP sont différemment produits le long du thalle et pourraient expliquer la spécificité et les variations de l'épimicrobiote observé (Paix et al., 2020). Cette observation avait déjà été effectuée chez l'algue brune *Fucus vesiculosus* (Parrot et al., 2019). Ainsi, le microbiome bactérien exerce une influence significative sur la santé, la fitness et la capacité des macroalgues à se défendre contre les pathogènes (Egan et al., 2013; Singh et al., 2015; Singh and Reddy, 2016; Wahl et al., 2012). Cet impact positif est régit par des interactions finement contrôlées impliquant la production de médiateurs chimiques spécifiques qui jouent un rôle clé dans le maintien de l'équilibre de la relation hôte-microbiome (Burgunter-Delamare, 2022; Coelho-Souza et al., 2017; Dittami et al., 2016; Goecke et al., 2010).

Le rôle écologique des champignons associés aux macroalgues a été très peu exploré contrairement à celui des champignons terrestres (Boddy, 2016; Suryanarayanan, 2012). Comme dans les écosystèmes terrestres, les champignons peuvent être parasites (et pathogènes), mutualistes mais également symbiontes d'autres eucaryotes, notamment comme chez les algues (Jones and Pang, 2012; Kohlmeyer and Demoulin, 1981; Potin et al., 2002). Chez l'algue brune *Ascophyllum nodosum* (Ochrophyta), le champignon endophyte *Mycophycias ascophylli* est suggéré protéger l'algue de la dessiccation et produire des

composés bioactifs qui luttent contre les pathogènes. En retour, l'algue fournit des nutriments (Fries, 1988, 1979; Garbary and London, 1995; Garbary and MacDonald, 1995). Aucun *Ascophyllum nodosum* dans son milieu naturel n'a été retrouvé sans le symbionte *Mycophycias ascophylli*, suggérant ainsi le rôle important du champignon associé. Par ailleurs, chez *Fucus serratus*, il a été mis en évidence que les spores d'*Acremonium fuci* ne peuvent germer qu'en présence de tissu algal (Zuccaro et al., 2004) sous-entendant également l'existence d'interactions algues-champignons. De plus, certains champignons endophytes associés aux macroalgues brunes produisent également des composés antibiotiques, antifongiques, antioxydants et larvicides (Fan et al., 2019; Flewelling et al., 2015; Sarasan et al., 2017). Vallet et al. ont mis en évidence le rôle crucial joué par les métabolites des champignons endophytes associés aux algues brunes contre les protistes pathogènes (Vallet et al., 2018) ou impliqués dans la régulation du QS bactérien.

Les données concernant les champignons épiphytes et leur rôle dans le fonctionnement de l'holobionte sont encore rares et parcellaires, et ce quelle que soit la macroalgue étudiée. Des travaux ont néanmoins révélé que les champignons épiphytes sont aussi capables de synthétiser des métabolites secondaires qui contribuent à la santé des algues (Harvey and Goff, 2010; Loque et al., 2010; Zuccaro et al., 2008, 2003). Cette lacune en ce qui concerne notre compréhension du rôle des champignons au sein de l'holobionte des macroalgues brunes motive à étudier ce modèle qui peut représenter un réservoir original pour la découverte de nouveaux composés bioactifs.

### **C. L'holobionte une source de molécules bioactives potentiellement valorisables**

Les activités biologiques de certains extraits d'holobiontes marins tels que des macroalgues, herbiers marins, coraux et lichens ont été rapportées dans de nombreuses études (Hardoim and Costa, 2014; Liu et al., 2021; Parrot et al., 2015; Shnit-Orland et al., 2012; Suzuki et al., 2016; Tarquinio et al., 2019). Dans le monde marin, les macroalgues sont parmi les sources les plus riches de composés bioactifs connus et nouveaux (Blunt et al., 2006; Noorjahan et al., 2022). Plus de 150 000 espèces de macroalgues ou d'algues se trouvent dans les océans du monde entier, mais seules quelques-unes d'entre-elles ont été étudiées et identifiées comme productrices de composés d'intérêts (Bansemir et al., 2006). Par exemple,

les macroalgues brunes contiennent des fucoxanthines, composées aux activités antitumorale, antioxydante et anti-obésité (Gammone and D’Orazio, 2015; Karpiński and Adamczak, 2019; Mise et al., 2011; Xiao et al., 2020).

De nombreux holobiontes marins sont également producteurs de composés phénoliques. Ces composés sont très connus chez les plantes (comme les flavonoïdes) car ils interviennent dans des mécanismes de défense contre les microorganismes pathogènes et les stress environnementaux (UV, blessures)(Jorgensen, 1993; Noorjahan et al., 2022; Sugiyama, 2021). Il a été rapporté que les stéroïdes et les esters d'acides gras de l’algue rouge *Acanthophora spicifera* présentent une puissante activité antitumorale et antibactérienne contre les lignées cellulaires cancéreuses humaines et les microorganismes (Morales et al., 2006; Noorjahan et al., 2022). Toujours chez des algues rouges, *Delisea pulchra* est chimiquement défendue par des furanones halogénées, métabolites secondaires qui interfèrent avec les systèmes de signalisation cellulaire de nombreuses bactéries (De Nys et al., 1995). Certains genres bactériens semblent particulièrement pertinents pour isoler de nouveaux composés biologiques d’intérêts (Egan et al., 2008). Les Actinobactéries sont d’importantes productrices d’antibiotiques comme montré au sein de l’holobionte de *Saccharina latissima* (Wiese et al., 2009a). Ces métabolites appartiennent aux polycétides, peptides, glycolipides, alcaloïdes et pyrones et ont été détectés au sein d’holobiontes d’algues brunes, vertes et rouges (Xiong et al., 2023). Les substances produites par les *Pseudoalteromonas* se caractérisent par un faible poids moléculaire et une grande variété d’activités biologiques (antibactérienne, antifongique, agarolytique, algicide et antibiofilm) (Bowman, 2007; Holmström and Kjelleberg, 1999; Wang et al., 2022a). Par ailleurs, les Roseobacters, un clade fonctionnellement diversifié, produisent des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) ou des clusters PKS, et présentent chez de nombreuses espèces des activités antibactériennes (Bruhn et al., 2007; Egan et al., 2008; Martens et al., 2007). Il a notamment été montré que des Roseobacters isolés de différentes macroalgues produisent des molécules de signalisation de type *N*-acyl-homoserine lactone (AHLs), mais également des analogues, les 9-hexadécénoylalanine. Ces composés ont montré une activité anti-algale contre la diatomée *Skeletonema costatum*, en impactant les mécanismes d’attachement de la diatomée (Ziesche et al., 2015).



Les macroalgues ne possèdent pas de système immunitaire à proprement parler mais les microorganismes présents à sa surface et les composés qu'ils produisent lui confèrent une protection et permettent une défense chimique. Les champignons pourraient également être impliqués dans cette activité car ils sont d'importants producteurs de composés actifs (Aly et al., 2011). Entre 2011 et 2012, 138 nouveaux produits naturels fongiques ont été mis en évidence et présentent des activités cytotoxiques, anti-infectieuses, antioxydantes et antibiofilms (Debbab et al., 2012). En effet, Flewelling et son équipe ont montré que 43 des 79 souches fongiques provenant de macroalgues (rouges, vertes et brunes dont *Saccharina latissima*) étaient capables de produire des antibactériens et antifongiques (Flewelling et al., 2013a). Ces activités antimicrobiennes, larvicides, antifongiques et antibiofilms des champignons associés à des macroalgues ont également été confirmées par d'autres études (Fan et al., 2019; Flewelling et al., 2015, 2013b; Sarasan et al., 2017; Silber et al., 2016; Vallet et al., 2020).

Ainsi, l'hobionte des macroalgues produit une grande variété de composés biologiquement actifs qui peuvent avoir un potentiel industriel. Les substances qui reçoivent actuellement le plus d'attention de la part des industriels dans le domaine comprennent : les polysaccharides sulfatés comme substances antivirales ; la kahalalide F comme traitement du cancer du poumon (tumeurs), métastases et du SIDA (Smit, 2004) ; et les furanones halogénées de *Delisea pulchra* comme composés antifoulings (Rasmussen et al., 2000).

Une meilleure connaissance des écosystèmes marins, en particulier des interactions au sein des holobiontes marins peut permettre d'identifier, d'isoler et de produire à grande échelle des métabolites secondaires originaux à partir des microorganismes isolés. Dans ce sens, l'épimicrobiote algal est un biofilm complexe où les interactions chimiques sont intenses et pluridirectionnelles (Wahl et al., 2012). Ainsi, la production de toxines, de molécules de signalisation et d'autres métabolites secondaires par ce biofilm, en tant que stratégie de compétition et de défense contre les pathogènes, constitue un réservoir sans précédent pour la découverte de composés inconnus (Egan et al., 2008). Ces composés d'intérêts pourront à terme être utilisés dans le domaine industriel en pharmacologie, pour la production de cosmétiques ou de nutraceutiques.

## D. Les approches multi-omiques pour étudier l'holobionte algal

### D.1) Les approches « omiques »

Le terme "omique" fait référence à l'étude d'un organisme ou d'un système en biologie tels que le génome (génomique), le transcriptome (transcriptomique), le protéome (protéomique), ou le métabolome (métabolomique). Les récentes avancées en matière d'analyses à haut débit ont permis le développement des omiques basées sur l'étude d'une grande diversité de structures moléculaires au sein d'un organisme. Par ailleurs, le terme « méta-omique » désigne, quant à lui, l'ensemble des technologies permettant d'appréhender des systèmes biologiques complexes et dynamiques dans leur globalité comme les holobiontes ou les biofilms. Les données omiques sont générées à partir de technologies de pointe telles que le séquençage nouvelle génération (NGS) de l'ADN, le séquençage de l'ARN, la spectrométrie de masse et d'autres techniques analytiques avancées permettant d'obtenir de nombreuses données simultanées (**Figure I.5**). Les « multi-omiques » font référence à une approche qui consiste à analyser simultanément plusieurs types de données biologiques (métagénomique et métabolomique par exemple). Ainsi, en combinant ces différentes sources de données, une compréhension plus approfondie et plus intégrative des interactions complexes et des réseaux biologiques peut être obtenue. Cette approche est devenue de plus en plus importante dans la recherche, car elle offre une vision plus complète des systèmes biologiques, qui peut conduire à des avancées dans la compréhension du fonctionnement de systèmes complexes comme celui des holobiontes.

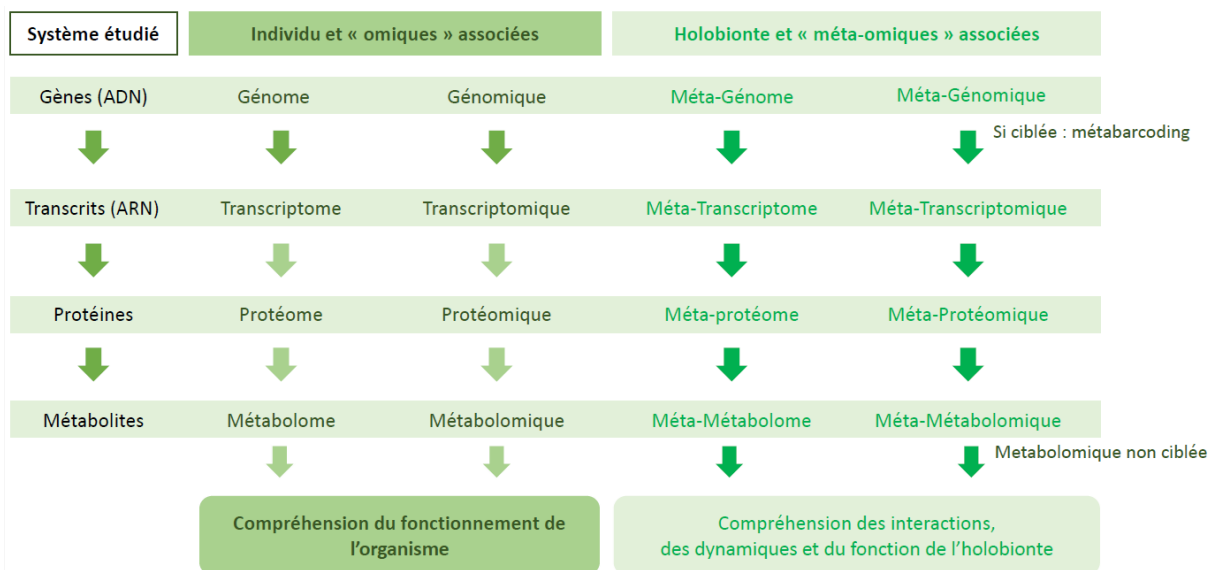


Figure I.5 : Schéma de la cascade « omiques » (inspiré de Carriot, 2022)).

## D.2) Approches -omiques chez l'holobionte algal

Comme mentionné précédemment, les holobiontes sont des systèmes complexes caractérisés par une diversité microbienne importante et des interactions chimiques complexes. Une compréhension exhaustive de leur fonctionnement exige une exploration approfondie de la diversité génétique, protéique, métabolique, tout en tenant compte de multiples facteurs biotiques et abiotiques impactant l'holobionte. Concernant les macroalgues, quelques études témoignent de l'importance et de la nécessité de ces approches complémentaires pour la compréhension des holobiontes (Saha et al., 2011; Saha and Wahl, 2013; Tourneroc et al., 2019). Par ailleurs, l'une des premières études d'analyses multi-omiques est celle de Parrot et al., 2019, qui a analysé et cartographié le microbiote et le métabolome de surface chez une macroalgue brune, *Fucus vesiculosus* (Parrot et al., 2019). Depuis, Paix et al., avec pour modèle d'étude l'épimicrobiote de *Taonia atomaria*, ont mis en évidence un lien entre variations intra-thalliques du métabolome, croissance de l'algue et communautés bactériennes (Paix et al., 2020). Des approches multi-omiques similaires appliquées au même modèle ont révélé des changements dans les métabolomes de surface en fonction des communautés bactériennes, qui, à leur tour, étaient influencées par des facteurs saisonniers, géographiques, et la présence de polluants tels que le cuivre (Paix et al., 2021b, 2021a, 2019). Ainsi, les approches multi-omiques ont permis d'acquérir des connaissances sur la régulation des microbiomes de surface par les communautés bactériennes des macroalgues brunes mais beaucoup d'autres mécanismes et interactions restent à explorer.

## Le modèle *Delisea pulchra*

*Delisea pulchra* est une macroalgue rouge (Rhodophyta, Florideophyceae, Bonnemaisoniales) ubiquiste d'Australie, de Nouvelle Zélande et des côtes d'Antarctique. Il s'agit du premier modèle d'holobionte algal pour lequel un intérêt a été porté à ses métabolites de défenses (**Figure I.6**). Ces composés, des furanones halogénées, sont stockés dans des cellules glandulaires



Figure I.6 : *Delisea pulchra*

spécialisées à l'intérieur du thalle (Dworjanyn et al., 1999) et possèdent une large gamme d'activités contre les bactéries pathogènes (Manefield et al., 2000, 1999), les biofoulers (De Nys et al., 1995; Dworjanyn et al., 2006) et les herbivores locaux (Wright et al., 2004, 2000).

Les furanones halogénées (**Figure I.7**) sont des analogues structuraux des *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) et interagissent avec le récepteur LuxR formant un complexe instable ce qui entraîne sa dégradation protéolytique (Manefield et al., 2000, 1999). Chez les bactéries, le QS régule de nombreux phénotypes tels que la formation de biofilm, la colonisation de surfaces et la pathogénicité (Fuqua et al., 1994). Les tests d'activités *in situ* ont montré que l'activité de ces composés était liée à une inhibition de l'attachement des bactéries (Maximilien et al., 1998). L'algue se défend également chimiquement en exerçant une pression de sélection importante sur son microbiome (Longford et al., 2019).

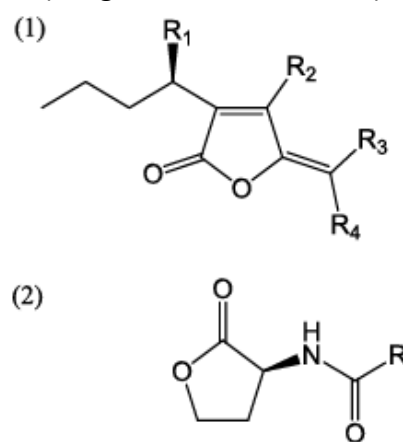


Figure I.7: (1) Structure des furanones halogénées (2) Structure des AHLs

En période estivale, *D. pulchra* est touchée par un phénomène de blanchissement lors de l'augmentation de la température de l'eau, causé par une diminution de l'expression des furanones halogénées chez les individus malades (Campbell et al., 2011). Cette diminution d'expression des inhibiteurs de QS entraîne l'activation de facteurs de virulence chez un consortium de pathogènes opportunistes (Case et al., 2011; Fernandes et al., 2011; Kumar et al., 2016; Zozaya-Valdes et al., 2015).

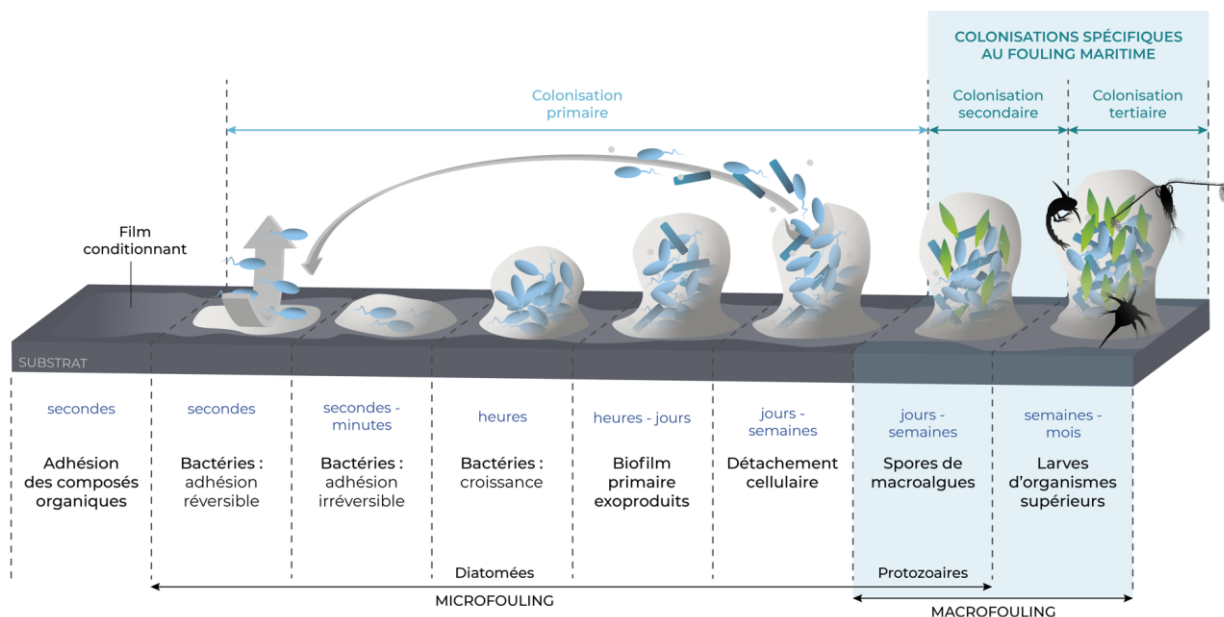
Ainsi, la capacité de *D. pulchra* à interférer spécifiquement avec le QS bactérien via la production de furanones halogénées représente une puissante stratégie de défense des algues (Harder et al., 2012). Par ailleurs, les furanones halogénées se sont montrées être des inhibiteurs de colonisation microbienne efficaces dans le contexte de biofouling marin (De Nys et al., 1995; Dworjanyn et al., 2006). Cependant, ces composés sont particulièrement toxiques pour les microorganismes et les animaux (Kuehl et al., 2009). Cette stratégie d'inhibition du biofilm microbien par ce type de composés inspire actuellement de nombreuses recherches portant sur des solutions antifouling plus éco-compatibles.

## 2. La lutte contre le biofouling : état des lieux et enjeux pour l'avenir

Les biofilms sont des communautés complexes de microorganismes en contact avec une surface et incluses dans une matrice qu'elles sécrètent (Costerton et al., 1987). Omniprésents dans les environnements, ils jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes et les cycles biogéochimiques (Falkowski et al., 1998). La colonisation de surface ainsi que le développement et la formation de biofilms engendrent de multiples avantages pour ces organismes, leur permettant de supporter les conditions stressantes ou critiques dans un environnement marin changeant (Dang and Lovell, 2015).

### A. Le biofouling, ses conséquences économiques et écologiques

En milieu marin, les biofilms microbiens se développent sur l'ensemble des surfaces immergées. Ce phénomène, appelé « biofouling » (ou encrassement biologique) est à l'origine de nombreux problèmes dans le domaine océanographique, pour les activités marines militaires et civiles (Yebra et al., 2004). Le biofouling est un phénomène complexe et multifactoriel impliquant de nombreuses espèces et mécanismes (**Figure I.8**). Ce processus de colonisation débute quelques heures après l'immersion d'un substrat. Les bactéries et les microalgues s'y fixent puis s'agencent progressivement pour former des agrégats qui évoluent jusqu'à former un biofilm microbien (microfoulers). Ce microfouling est enchevêtré au sein d'une matrice composée d'exopolymères variés tels que des polysaccharides et des protéines. Cette matrice microbienne joue le rôle de substrat propice à la colonisation ultérieure par des organismes de plus grande taille, notamment des macroalgues et des métazoaires, regroupés sous le terme de macrofoulers (Satheesh et al., 2016; Schultz et al., 2011; Uher et al., 2017). Lorsque le biofilm est mature, certaines bactéries vont produire des signaux de détachement leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces. L'agencement en biofilm offre aux microorganismes la capacité de s'adapter promptement et de résister à diverses contraintes environnementales, telles que la carence en nutriments, les variations de pH et de température, l'exposition à des agents toxiques (antibiotiques, biocides) ou encore la résistance aux fortes turbulences (Dang and Lovell, 2015).



**Figure I.8 :** Représentation schématique de la formation du biofouling marin

Ce phénomène biologique naturel, indispensable au bon fonctionnement des écosystèmes, constitue cependant une menace pour les structures artificielles telles que les coques de bateaux, les structures portuaires, les infrastructures pétrolières, les hydroliennes et les structures immergées des éoliennes (**Figure I.9**). Le biofouling entraîne d'importants problèmes à différentes échelles (Champ, 2003; Gu et al., 2020; Schultz et al., 2011). En effet, les biofilms contribuent à l'accroissement du poids des navires, intensifient les forces de friction, ce qui en retour diminue la vitesse et génère une surconsommation de carburant (jusqu'à 40% pour un niveau prononcé de colonisation) (Champ, 2000). Les répercussions ne se limitent pas à l'aspect énergétique, car les biofilms ont également un effet corrosif sur les matériaux, ce qui peut compromettre l'intégrité structurale des surfaces touchées. Ils vont également nuire au bon fonctionnement des instruments et des équipements sous-marins en provoquant des obstructions dans les canalisations et les systèmes de filtration, entraînant ainsi de potentiels retards opérationnels ainsi que des coûts de maintenance accrus (Bloecher et al., 2013; Schultz, 2007). L'impact s'étend également à l'aquaculture, où ce phénomène se traduit notamment par l'encrassement des infrastructures. Cet encroûtement limite les échanges d'eau essentiels et accroît le risque de maladies. Les estimations convergent généralement vers une incidence de 5 à 10 % sur les coûts de production (équivalent à une somme de 1,5 à 3 milliards de dollars annuellement) (Fitridge et al., 2012). Ces chiffres soulignent l'urgence et la nécessité impérieuse de développer des méthodes et des

technologies d'atténuation hautement efficaces pour contrer les effets dommageables du biofouling.



**Figure 1.9** : Biofouling présent sur diverses structures immergées en mer. (A) Coque d'un bateau. (New Biofouling Regulations © Ministry for Primary Industries) (B) Structure aquacole Kiel Marine Farm (KMF) (<https://www.h2020united.eu/>) (C) Structure offshore en cours de nettoyage. (Seatrade Maritime News, <https://mfame.guru/bio-fouling-ballast-water-barnacle-bill/>) (D) Epave d'un tractopelle immergé dans la baie de Banyuls-sur-Mer depuis 1983. Fanny Clergeaud, 2022

Au niveau écologique, le biofouling engendre la dispersion d'espèces par la surface des coques de bateaux (Godwin, 2003; Letschert et al., 2021; Molnar et al., 2008; Piola et al., 2009). Ainsi, les navires deviennent des vecteurs d'introduction d'espèces exotiques, potentiellement invasives et peuvent contribuer au dérèglement des écosystèmes sur le long terme (Blackburn et al., 2019; Ruiz et al., 1997; Shucksmith and Shelmerdine, 2015). Ces organismes allochtones vont coloniser et s'adapter à leur nouvel habitat où les prédateurs et compétiteurs spécifiques ne sont pas présents. Par la suite, ils vont envahir de nouvelles zones géographiques et se répandre dans les habitats favorables à leur prolifération au détriment des espèces autochtones. Les exemples de possible introduction d'espèce exogène à travers le biofouling des navires ne manquent pas (Carlton, 1999). Farrapeira et al. a notamment déterminé que les coques de navires étaient le principal vecteur de l'introduction de 308 espèces d'invertébrés sur 343 étudiés (Farrapeira et al., 2011).

## B. Les stratégies antifoulings et leurs limites

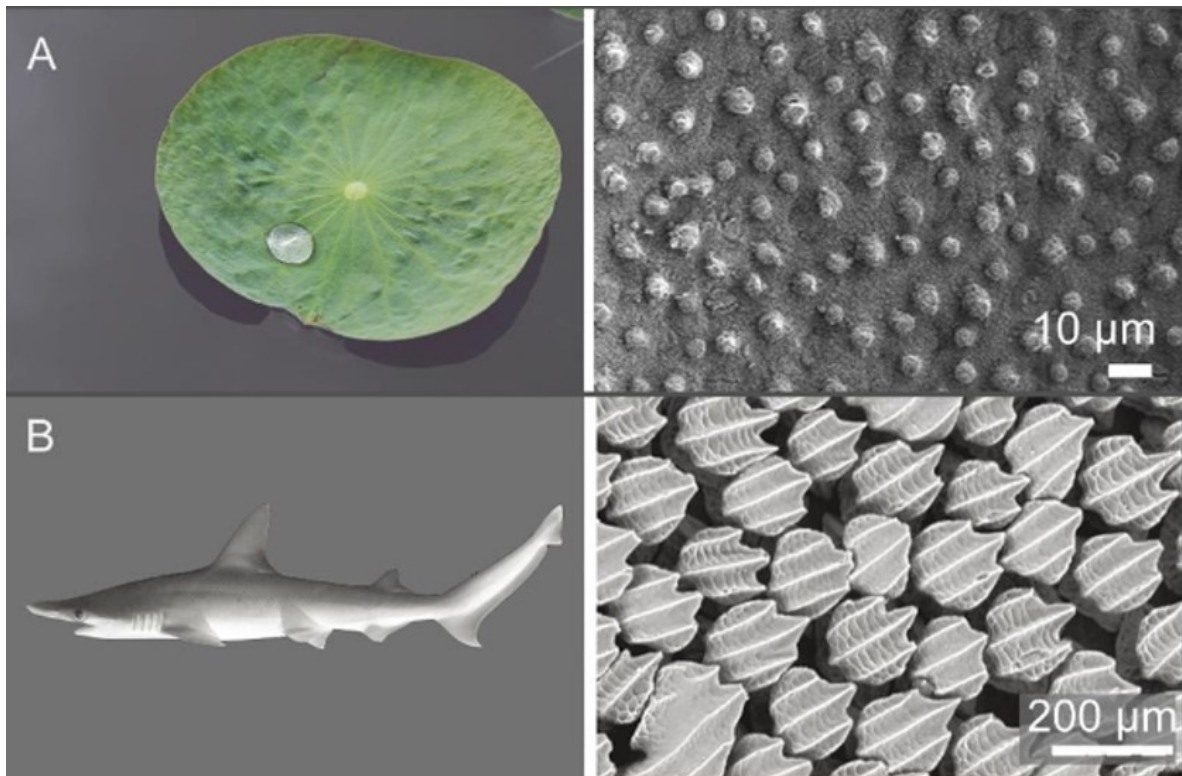
Compte tenu de l'impact économique et écologique majeur de ces biofilms, des substances antifouling ont été développées. La stratégie la plus utilisée est d'éradiquer les organismes avec des peintures antisalissures chimiquement actives, appelées peintures antifouling (Bressy and Lejars, 2014). Les premières preuves de la lutte antifouling datent de l'Antiquité : goudrons, cires, revêtements à base d'arsenic ou de divers métaux lourds étaient alors appliqués sur la coque des navires afin de retarder l'apparition des organismes encroûtants (Callow, 1990). C'est à partir du XIXe siècle que les premières applications industrielles se développèrent, avec un usage récurrent de divers poisons à base d'oxydes de cuivre, de mercure ou d'arsenic, très nocifs pour la santé humaine (Bunet, 2020; Omae, 2003). Par la suite, des revêtements antifouling constitués d'organoétains comme le tributylétain (TBT) se sont développés et leur usage s'est démocratisé à partir des années 1960 avec une production atteignant les 40 000 tonnes au milieu des années 1980 (Omae, 2003). Incorporé aux peintures de bateaux, le TBT agit comme un biocide à large spectre et est efficace jusqu'à 5 ans. Malgré le fait que cet antifouling soit particulièrement efficace, il s'est révélé particulièrement dévastateur pour l'environnement. Les composés toxiques issus du TBT libérés lors du lessivage dans l'environnement ont entraîné des dommages environnementaux considérables, même à de faibles concentrations (Alzieu et al., 1986; Birchenough et al., 2002; Bryan et al., 1986; Waldock and Thain, 1983). En 2001, l'Organisation Maritime Internationale proposait de bannir l'usage des organoétains à compter de 2003, cette interdiction a été effective à partir de 2008. Ainsi, de nombreux gouvernements ont restreint ou même interdit son utilisation. Ces nouvelles réglementations ont conduit à un usage plus important d'autres substances biocides et les peintures à base de cuivre ou de zinc (tels que les izothiazolinones et l'irgarol) ont gagné des parts de marché. Bien qu'ils soient moins toxiques pour l'environnement que le TBT, ces composés s'accumulent dans les organismes (poissons, crustacés, bivalves) et leurs impacts sur la vie marine est également préoccupant (Flemming and Trevors, 1989; Guardiola et al., 2012; Hites et al., 2004; Thomas and Brooks, 2010).

De nos jours, deux grands types de peinture antifouling se partagent le marché : les peintures avec biocides, encore majoritairement employées, et les Fouling Release Coating (FRC). Les FRC sont des revêtements constitués de polymères hydrophiles (à base de



polyéthylène glycol (PEG) ou de silicone par exemple) et de zwitterions (Lejars et al., 2012). Les FRC présentent des propriétés physiques qui limitent l'adhésion des organismes et favorisent le détachement du biofilm sous l'effet d'une contrainte hydrodynamique. Cependant, cette efficacité est limitée par le fait que le navire doit être régulièrement en mouvement. Cet obstacle tente d'être résolu par des peintures hybrides à la fois FRC et biocides (Lejars et al., 2012). Toutefois, leur mise au point est assez complexe et la composition en huile siliconée pourrait se révéler toxique pour l'environnement.

Afin de limiter l'impact de l'homme sur le milieu marin, de nouvelles alternatives ont peu à peu été développées, en particulier dans des conditions d'hydrodynamisme limité, telles que les surfaces microtopographiques artificielles (Bhushan, 2009; Bhushan et al., 2009; Nosonovsky and Bhushan, 2008). La topographie d'une surface détermine sa mouillabilité et ses caractéristiques affectent la bio-adhésion des organismes. Ces solutions « biomimétiques » s'inspirent donc de surfaces peu colonisées et qui ne retiennent pas l'eau comme la peau des requins ou les feuilles de lotus (**Figure I.10**)(Jin et al., 2022). L'objectif est donc d'imiter ces topographies afin de fabriquer des surfaces avec une activité antisalissure. Cependant, cette efficacité est limitée par la diversité d'organismes que peut contenir un biofilm marin entraînant une grande diversité de mécanismes d'adhésion et par le prix de la mise en place d'une telle solution. Actuellement, aucune alternative durable et respectueuse de l'environnement n'a été développée à grande échelle pour résoudre ce problème environnemental majeur. Cependant, toujours dans une optique de biomimétisme, les macroalgues sont capables de réguler leur encrassement microbien par de nombreux composés tels que des alcaloïdes, pyrroles et terpénoïdes (Dahms and Dobretsov, 2017). Ces composés d'origine naturelle ciblent les mécanismes sous-jacents à la formation des biofilms, et se révèlent en mesure d'inhiber le biofouling sans altérer la viabilité cellulaire des microorganismes ni de l'algue elle-même. Ainsi, cette approche, particulièrement prometteuse, permet de mettre en évidence des composés peu toxiques et bénéfiques à la préservation des écosystèmes et à la santé humaine.



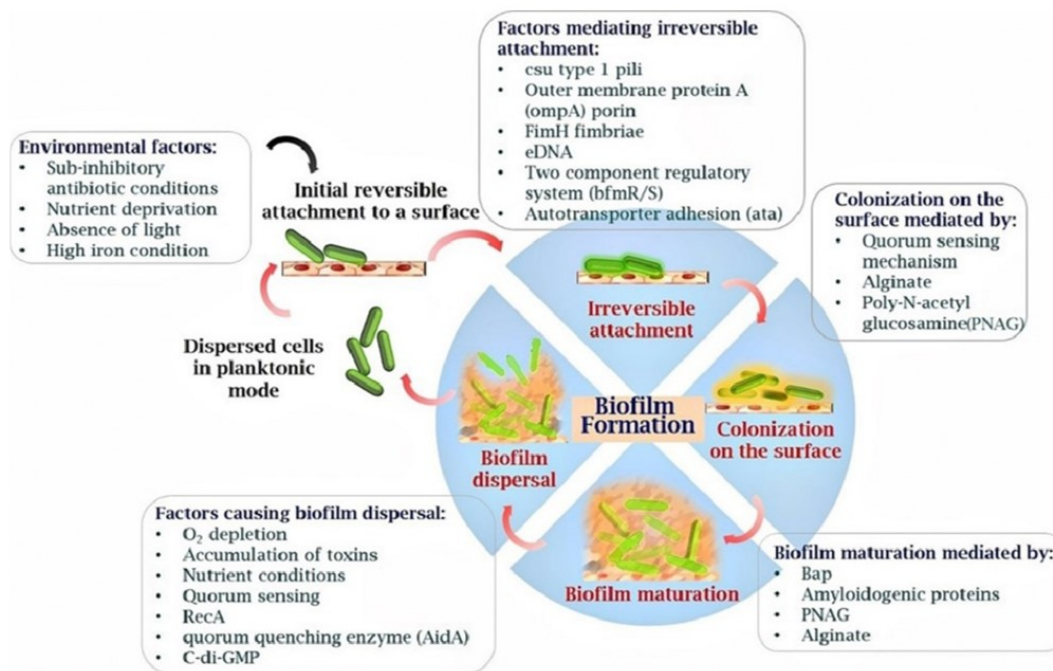
**Figure 1.10** : Exemples de surfaces microtopographiques (A) Photographie d'une feuille de lotus et de ses microstructures en microscopie électronique à balayage (MEB) (Li et al., 2019) (Elsevier © 2019). (B) Photographie d'un requin et des microstructures de sa peau en microscopie à balayage (MEB) (Wen et al., 2014) (Company of Biologists Ltd. © 2014). Issu de (Jin et al., 2022).

### 3. Intérêt des molécules antifouling qui ciblent les mécanismes clés dans la formation de biofilm.

Comme expliqué précédemment, les surfaces immergées sont naturellement colonisées en premier lieu par des microorganismes. La structure même du biofilm créé offre une surface d'adhérence propice à l'accrochage d'autres microorganismes et de macrofoulers, entraînant ainsi le développement du biofouling. Pour répondre à ces défis, une approche prometteuse consiste à identifier des composés ciblant spécifiquement les mécanismes clés responsables de la formation des biofilms, tout en préservant la viabilité cellulaire. En orientant notre attention vers ces mécanismes fondamentaux, détaillés dans cette section, il devient possible de s'attaquer aux premières étapes de la formation du biofilm et de restreindre considérablement la colonisation des surfaces immergées. Cette section se penche sur cette stratégie innovante visant à cibler les mécanismes de formation du biofilm pour prévenir efficacement le problème du biofouling.

## A. Mécanismes impliqués dans la formation d'un biofilm

Composé de communautés de bactéries, d'archées, de cyanobactéries et d'eucaryotes (champignons, microalgues), le biofilm est un assemblage complexe qui se forme en plusieurs étapes (Costerton et al., 1987; Pochon et al., 2015). Ces étapes sont guidées par des signaux chimiques spécifiques et sont influencées par des facteurs extérieurs tels que la température, le pH, les mouvements de l'eau et le type de surface (Ophir and Gutnick, 1994; O'Toole and Kolter, 1998; Poulsen et al., 1993; Pringle and Fletcher, 1986). La formation de biofilm peut être divisée en 4 étapes (**Figure I.11**) (1) l'attachement réversible puis irréversible (2) l'agrégation (3) la maturation du biofilm et enfin (4) la séparation et diffusion des microorganismes (Liu et al., 2023; O'Toole et al., 2000). Lors de l'attachement initial, les microorganismes captent des molécules organiques (protéines, lipides, polysaccharides) ou des molécules inorganiques (sel, minéraux) pour former une couche superficielle qui les protège. La régulation de la synthèse des flagelles est essentielle à cette étape (O'Toole and Kolter, 1998; Römling et al., 2013). Ces microorganismes produisent ensuite des protéines d'adhésion (fibronectine, vitronectine, peptidoglycane), se multiplient et s'agrègent en produisant des EPS (Substances Polymériques Extracellulaires). Une fois la matrice établie, d'autres microorganismes sont recrutés et ils contribuent à la structure du biofilm et à son métabolisme. La matrice offre une résistance aux stress oxydatifs, à la dessiccation, aux antibiotiques et facilite également la diffusion des molécules de communication cruciales pour le maintien du biofilm (Davey and O'toole, 2000). Ainsi, au sein d'un biofilm, il existe des interactions complexes entre les différents types de microorganismes (champignon-bactérie, micro-algue-bactérie, champignon-champignon, etc.)(Williams, 2007). La matrice contient également divers composés tels que des protéines, des métabolites secondaires, des ARN, de l'ADN et des polysaccharides (Davey and O'toole, 2000). Lorsque le biofilm atteint sa maturité, il finit par se rompre (passivement ou activement) et libère de nombreux microorganismes qui peuvent coloniser de nouvelles surfaces (O'Toole et al., 2000).



**Figure I.11** : Représentation schématique de la formation d'un biofilm chez un pathogène humain et diversité des mécanismes impliquée dans sa formation de biofilm (Upmanyu et al., 2022)

La signalisation cellulaire joue un rôle crucial à chaque étape du cycle de vie du biofilm. Il existe de nombreux systèmes de signalisation microbienne impliqués dans la colonisation de surface et le développement du biofilm. Trois principaux types de communication sont identifiés lors de la formation du biofilm :

- Le mécanisme de quorum sensing (QS), qui joue un rôle essentiel dans le processus et produisant une grande diversité de métabolites secondaires permettant de synchroniser de nombreux phénotypes (voir partie I.3.B) (Fuqua et al., 1994; Neilson, 1977; Schulz, 2014).
- Le monophosphate de guanosine dimère bis-(3'-5')-cyclique (c-di-GMP), qui régule la synthèse des flagelles et les pili de type IV (Kalia et al., 2013; Römling et al., 2013; Valentini and Filloux, 2016).
- Les petits ARNs non-codants, qui régulent les flagelles et la production d'EPS (Brombacher et al., 2006, 2003).

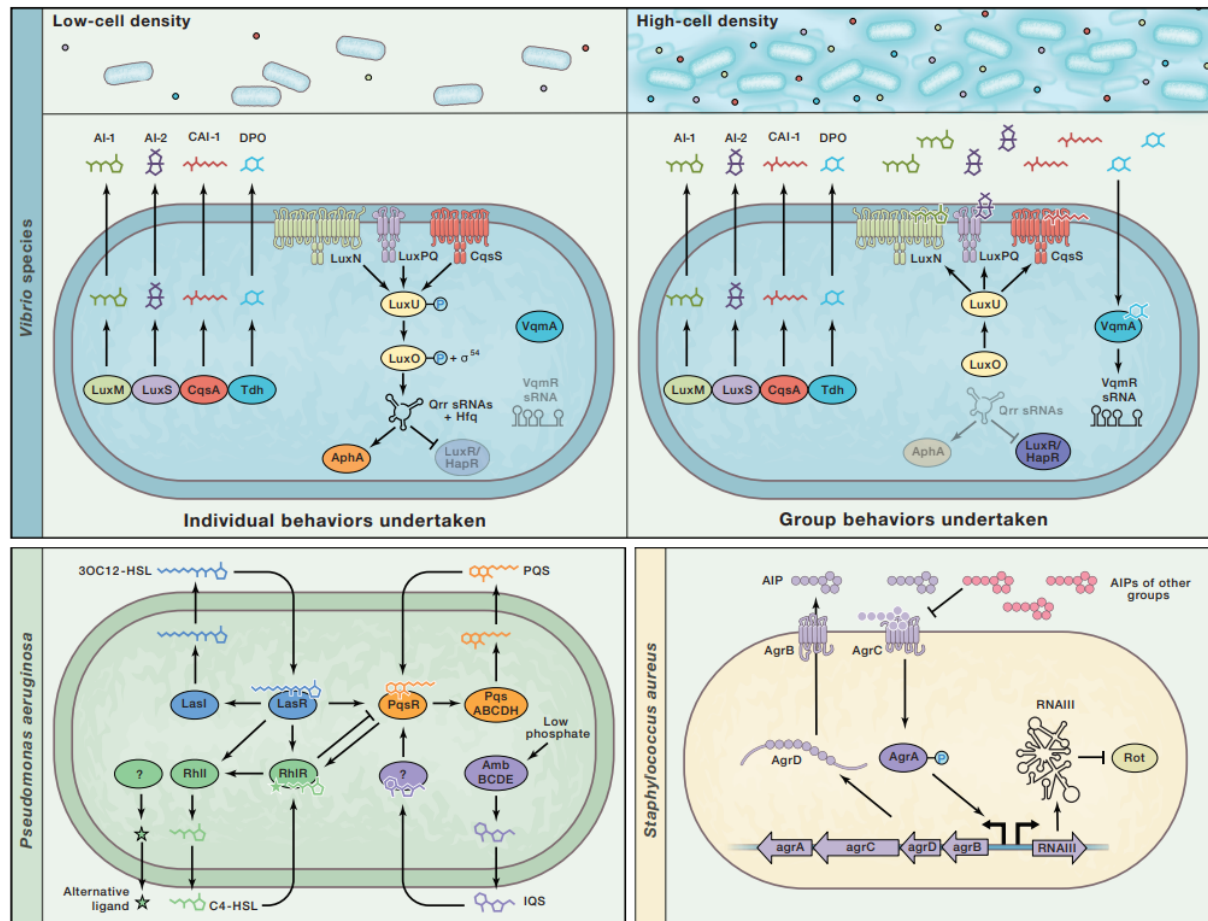
D'autres signaux existent comme les systèmes de transduction de signal (TCS) à deux composants (Capra and Laub, 2012; Dang and Jiao, 2014; Hazelbauer and Lai, 2010; Stock et al., 2000) dont la chimiotaxie fait partie (Hazelbauer and Lai, 2010; Nixon et al., 1986; Szurmant and Ordal, 2004; Wadhams and Armitage, 2004) ou le système AMPc-CRP (Kalivoda et al., 2013; McDonough and Rodriguez, 2012; Ono et al., 2014). Ces différents mécanismes impliqués dans la colonisation de surface et la formation de biofilm peuvent également être interconnectés comme chez *Vibrio cholerae* (Dang and Lovell, 2015).

## **B. La diversité des mécanismes du QS dans les biofilms marins et les holobiontes**

Les mécanismes du QS jouent un rôle central dans les biofilms et les environnements marins (Doberva et al., 2017; Lami, 2019). Le QS est défini comme une réponse coordonnée d'une population microbienne qui repose sur la production de signaux chimiques extracellulaires, également appelés auto-inducteurs (AI) (Fuqua et al., 1994; Waters and Bassler, 2005). Les bactéries génèrent continuellement des AI, mais lorsque la densité cellulaire augmente, les auto-inducteurs s'accumulent jusqu'à atteindre un seuil qui active des protéines réceptrices, provoquant un changement coordonné de l'expression des gènes (Diggle et al., 2007; Parsek and Greenberg, 2005; Whiteley et al., 2017). Ces gènes permettent notamment de réguler divers processus physiologiques tels que la motilité, l'attachement, la production d'EPS, la production d'enzymes protéolytiques, la sporulation ou encore la synthèse d'antibiotiques (Miller and Bassler, 2001).

Parmi les bactéries Gram-négatives, les composés du QS sont majoritairement des métabolites secondaires. Ces molécules sont capables de diffuser librement à travers la membrane cellulaire, se liant à des récepteurs internes spécifiques. Un exemple emblématique est le modèle *Vibrio fischeri* symbiotique de la sépiole *Euprymna scolopes*, où la synthèse (LuxI dépendante) de *N*-acyl-homoserine lactone (AHLs ou AI-1) et le récepteur LuxR coordonnent la transcription de gènes impliqués dans la bioluminescence (luxC,D,A,B,E,G) (Egland and Greenberg, 1999; Fuqua et al., 1994). Ce système peut être plus complexe donnant lieu à des cascades de signalisations moléculaires comme chez *Vibrio harveyi* (**Figure I.12**) (Lenz et al., 2004; Lilley and Bassler, 2000). En revanche, chez les bactéries Gram-positives, comme *Staphylococcus aureus* (**Figure I.12**), le système repose souvent sur la

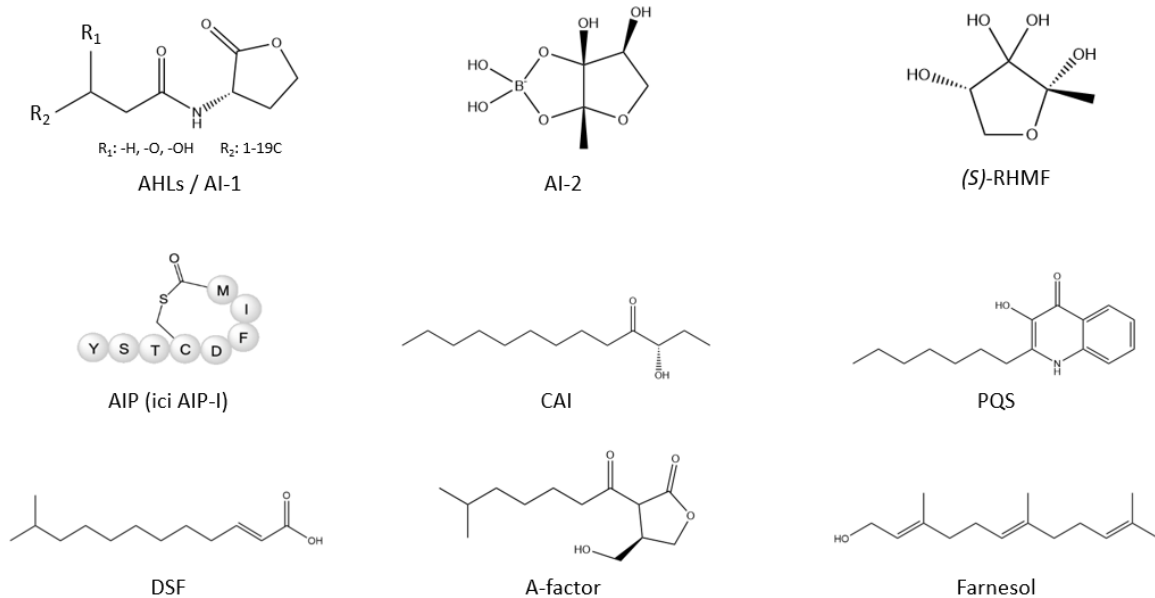
production d'oligopeptides (AIP), qui avec les récepteurs de kinase membranaires, régulent les facteurs de transcription influençant l'expression génique (LaSarre and Federle, 2013; Whiteley et al., 2017; Williams, 2007).



**Figure I.12** : Représentation schématique des différents systèmes de QS chez *Vibrio* sp., *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Eickhoff and Bassler, 2018).

Une grande diversité de composés est émise (**Figure I.13**), et les AHLs sont notamment les AI les plus couramment observés, caractérisées par un noyau homoserine-lactone *N*-acylé et d'une chaîne acyle de 4 à 19 carbones éventuellement modifiées (Doberva et al., 2017). Les auto-inducteurs de type 2 (AI-2), ou diester de borate furanosyl, sont présents chez les bactéries Gram-positives et négatives, parfois sous la forme du précurseur (2*S*,4*S*)-2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran, également appelé le (*S*)-THMF (Bassler, 1999; Chen et al., 2002; Henke and Bassler, 2004; Miller and Bassler, 2001). En plus des AIP allant de 5 à 34 résidus d'acides aminés, bien d'autres molécules ont été mises en évidence notamment des quinolones telles que le 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) chez *Pseudomonas aeruginosa*; le (*S*)-3-hydroxytriécane-4-one, également appelé cholerae autoinducer (CAI) chez

*Vibrio cholerae*; 2-isocapryloyl-3*R*-hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolactone (A-factor) de *Streptomyces griseus* ou encore le *cis*-11-méthyl-2-dodécénoic acid (DSF) de *Xanthomonas campestris* (Williams, 2007).



**Figure I.13:** Diversité des composés du QS bactérien et fongique.

Des mécanismes de type quorum sensing ont récemment été décrits chez les champignons (QSM), notamment chez la levure *Candida albicans* avec le farnesol qui interagit également avec les bactéries (**Figure I.13**). Les composés de QSM comme le farnesol, le phényléthanol et le tryptophol sont impliqués dans la morphogénèse, la pathogénicité, la formation de biofilms et la dispersion fongique (Mallick and Bennett, 2013; Martin, 2019; Padder et al., 2018; Wongsuk et al., 2016). Certains de ces composés sont impliqués dans la signalisation inter-espèces, permettant aux bactéries et aux champignons d'interagir via des composés spécifiques (Bamford et al., 2009; Chang et al., 2019a; Lee et al., 2007). Par exemple, la croissance filamenteuse de *Candida albicans* est affectée par les AHLs (oxo-C12-HSL) produites par *Pseudomonas aeruginosa* mais également par le farnesol qui inhibe sa production de PQS (Cugini et al., 2007; Hogan et al., 2004). Il a également été montré que les zoospores de macroalgues du genre *Ulva* sp. sont attirés par les biofilms bactériens qui produisent des AHLs et se fixent sur les bactéries productrices de ces composés. Ce mécanisme d'attraction n'est pas chimiotactique mais implique la chimiokinèse. En effet, lorsque les zoospores détectent les AHLs, leur vitesse est réduite entraînant l'accumulation

des cellules algales à la source de production d’AHLs (Joint et al., 2007; Tait et al., 2005; Wheeler et al., 2006).

Ces interactions inter-espèces à travers les mécanismes de QS sont particulièrement importantes au sein des holobiontes. Les microorganismes tirent parti de la densité cellulaire microbienne élevée au sein de ces micro-écosystèmes pour favoriser des interactions complexes (Bengtsson et al., 2010; Egan et al., 2013; González-Pech et al., 2024; Lami, 2019; Longford et al., 2019; van de Water et al., 2018). Les holobiontes ont été largement explorés pour leurs liens avec le QS, notamment au sein de la phycosphere, où un lien entre la croissance des microalgues et la régulation physiologique *via* le QS des souches bactériennes associées a été suggéré (Rolland et al., 2016). Par exemple, des études ont mis en évidence que des souches bactériennes en symbiose avec des microalgues sont capables d’émettre des signaux AHLs et d’AI-2, soulignant ainsi l’importance de considérer les relations QS au sein du microbiote des angiospermes marins (Blanchet et al., 2017). Les holobiontes cnidaires présentent également des interactions QS intéressantes (Ransome et al., 2014). En effet, les communautés bactériennes associées à ces organismes produisent des auto-inducteurs (30% des souches capables de faire du QS) (Rosenberg et al., 2007). Le rôle du QS chez *Vibrio* sp. pathogène de coraux a fait l’objet d’un intérêt particulier, bien que les mécanismes précis restent à élucider (Meyer et al., 2016; Zimmer et al., 2014). Des observations récentes ont également révélé des variations d’émission des signaux d’AHLs et d’AI-2 (activation ou inhibition) dans les consortiums de maladies polymicrobiennes associées aux coraux en fonction de paramètres environnementaux tels que la température (Tait et al., 2010). Chez les éponges marines, des études suggèrent que la communication chimique entre les symbiotes bactériens est répandue. Une grande diversité d’AHLs ont été détectées au sein des holobiontes spongiaires mais également des composés inhibiteurs de QS telles que la bromo-4-methoxyphenethylamine et 5,6-dibromo-*N,N*-dimethyltryptamine chez l’éponge *Sarcotragus spinosulus* (Britstein et al., 2018; Mohammed et al., 2020; Saurav et al., 2020; Taylor et al., 2004; Tintillier et al., 2020). Pour se défendre contre les pathogènes ou limiter leur biofouling de surface, de nombreux holobiontes comme les éponges, les coraux et les macroalgues mettent en œuvre des stratégies anti-QS en produisant des composés interférant avec ces mécanismes. Ce mécanisme anti-QS est nommé quorum quenching (QQ).

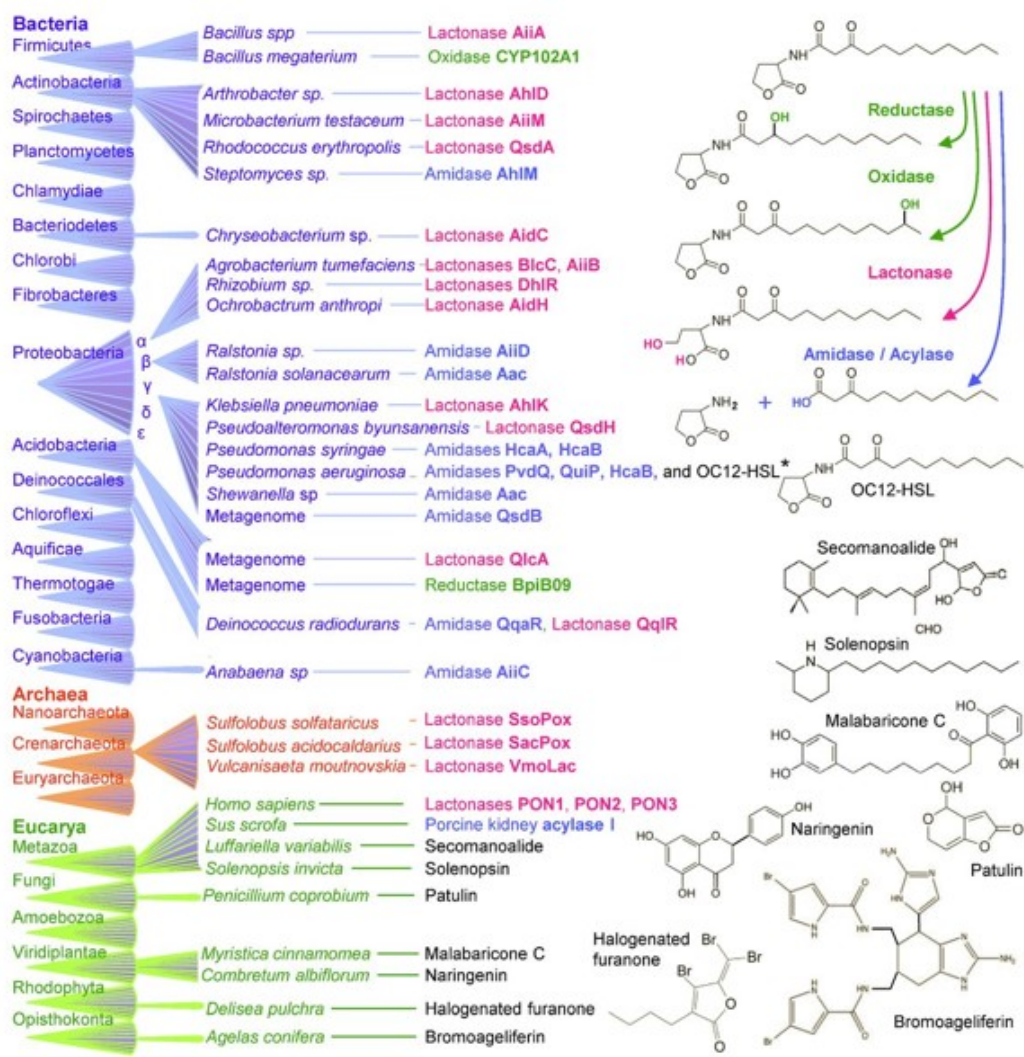


## C. La diversité des mécanismes anti-QS dans les biofilms marins et les holobiontes

De nombreux organismes, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, ont la capacité d'interférer avec les mécanismes QS. Les mécanismes d'interférence les plus couramment observés incluent la dégradation enzymatique de la molécule signal (appelée *quorum quencher*, QQ) et la production de molécules antagonistes qui entre en compétition avec les composés se fixant sur les récepteurs du signal (appelées *quorum sensing inhibitors*, QSI) (Grandclément et al., 2016).

Les enzymes comme les lactonases ouvrent le cycle homoserine lactone des AHLs (Uroz et al., 2008; Zhang et al., 2002). Les amidases clivent les AHLs au niveau de la liaison amide (Lin et al., 2003). La structure de ces enzymes est particulièrement variable tout comme leur activité enzymatique (réductase, amidase, acylase, oxydoréductase) (**Figure I.14**) (Grandclément et al., 2016). Bien que la plupart des recherches se soient concentrées sur les inhibiteurs des AHLs, il existe également des mécanismes d'inhibition pour d'autres signaux comme les PQS, les DSF et les AI-2 (LaSarre and Federle, 2013).

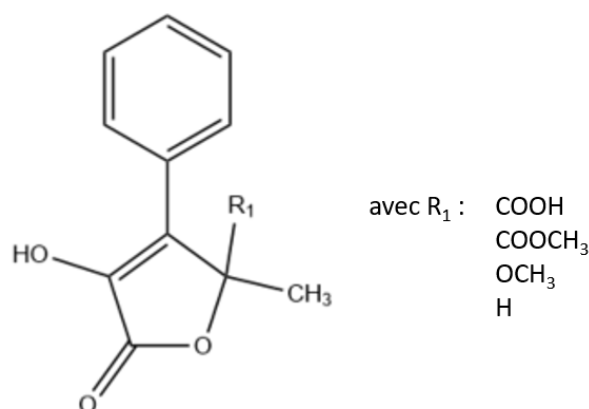
Les QSI sont des métabolites secondaires de structure variée qui ciblent les mêmes mécanismes de QS (**Figure I.14**). Ils ont été découverts chez des bactéries, des champignons et des plantes dans des environnements terrestres, marins et d'eau douce (Koh et al., 2013; Montgomery et al., 2013; Musthafa et al., 2010; Natrah et al., 2011; Skindersoe et al., 2008; Tello et al., 2011). Les premiers QSI découverts et les plus connus sont les furanones halogénées produites par la macroalgue rouge *D. pulchra*. Ces inhibiteurs d'AHLs et d'AI-2 permettent à l'algue de réguler son encrassement bactérien (Campbell et al., 2011; De Nys et al., 1995; Harder et al., 2012). Bien d'autres molécules ont été mises en évidence notamment des dicyclopeptides, des butyramides produits par des souches bactériennes (Chen et al., 2019; Gowrishankar et al., 2019; Lee et al., 2018; Li et al., 2023) ou encore les fucocoumarines et limonoïdes produits par des plantes (Girenavar et al., 2008; Koh et al., 2013; Vikram et al., 2010). Des  $\gamma$ -hydroxybuténolides produits par des éponges marines ont également été caractérisés (Stewart et al., 2009).



**Figure I.14** : Diversité des composés de QQ et QSI produits par les organismes des trois domaines du vivants (bactéries, archées et eucaryotes) selon Grandclément et al., 2016.

Les champignons marins sont également une source importante de composés bioactifs (Aly et al., 2011; Silber et al., 2016; Wiese and Imhoff, 2019). Ainsi, des composés anti-QS sont régulièrement isolés de souches fongiques. C'est notamment le cas du tyrosol et du farnesol qui font aussi partie du QSM (fongique) mais ont également une activité QSI (bactérien) importante (Albuquerque and Casadevall, 2012; Chang et al., 2019a). L'acide pénicillique, la patuline, des dicyclopeptides et des polyhydroxyanthraquinones ont été isolés à partir de *Penicillium* sp. d'origine marine (Chang et al., 2021; Joo et al., 2021; Li et al., 2023; Rasmussen et al., 2005). Même s'ils sont moins étudiés, des *Aspergillus* sp., *Furasium* sp., *Alternaria* sp. et *Cladosporium* sp. endophytes d'organismes marins ont également permis d'identifier de nouveaux QSI (Pattnaik et al., 2018; Rashmi et al., 2018; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2020; M. Zhang et al., 2018).

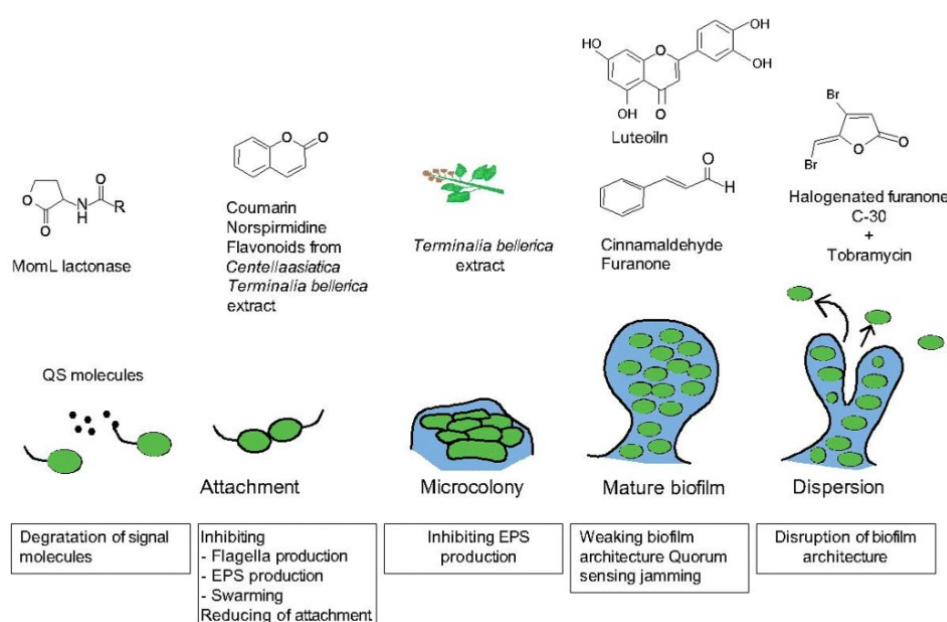
Les macroalgues marines et leurs microorganismes associés restent une des sources les plus prometteuses de nouveaux composés anti-QS et antifouling. En effet, depuis 2010, plus de 160 publications scientifiques ont mis en évidence des extraits de macroalgues ayant des propriétés antisalissures (Dahms and Dobretsov, 2017). Par exemple, la 3-bromo-5-(diphénulène)-2(5H)-furanone a été isolée de l'algue verte *Ulva rigida*, l'acide bromé de l'algue brune *Laminaria digitata* et le dulcitol de l'algue brune *Spatoglossum* sp.. Ces activités antifouling et anti-QS sont retrouvées dans de nombreux extraits totaux d'algues rouges, vertes et brunes notamment ceux de *Saccharina latissima* mais les composés ont rarement été isolés et caractérisés (Borchardt et al., 2001; Dahms and Dobretsov, 2017). Plusieurs études ont mis en évidence que les microorganismes épiphytiques de macroalgues sont capables de produire des composés anti-QS faisant d'eux des modèles particulièrement prometteurs (Burgess et al., 2003; Dahms and Dobretsov, 2017; Holmström and Kjelleberg, 1999; Kanagasabhapathy et al., 2009; Satheesh et al., 2016). Les travaux de nos deux laboratoires, notamment ceux d'Anne Tourneroché, ont démontré que les endophytes bactériens et fongiques de *Pelvetia canaliculata*, *Laminaria digitata* et *Saccharina latissima* produisent des composés anti-QS notamment des inhibiteurs d'AI-2 (Tourneroché et al., 2019). Quatre nouveaux inhibiteurs d'AHLs de la famille des  $\alpha$ -hydroxy  $\gamma$ -butenolides ont également été isolés à partir du champignon endophyte *Paradendryphiella salina* issu de différentes algues brunes (Vallet et al., 2020)(**Figure I.15**). Les microorganismes épiphytes d'algues brunes telle que *Saccharina latissima* semblent donc être une source inexploitée de composés anti-QS et antifouling.



**Figure I.15** : Nouvelles  $\alpha$ -hydroxy  $\gamma$ -butenolides extrait de la souche fongique endophyte *Paradendryphiella salina* isolée de macroalgues brunes (Vallet et al., 2020).

## D. Limites des composés actuels et intérêts de recherche de nouveaux composés

Les composés anti-QS sont des molécules qui peuvent combattre les biofilms sans nuire aux cellules vivantes, faisant d'eux des candidats prometteurs pour de nouveaux antifouling éco-compatibles (**Figure 1.16**). Bien que de nombreux composés naturels antifouling aient déjà été identifiés, tels que les furanones, lactones, peptides, phénols, caroténoïdes, alcaloïdes et terpénoïdes, leur toxicité n'a pas toujours été évaluée.



**Figure 1.16** : Impact des composés anti-QS sur le biofilm (Paluch et al., 2020)

Pourtant, cette évaluation est cruciale, elle est calculée en utilisant la concentration efficace provoquant 50% de l'activité de l'antifouling ( $CE_{50}$ ) et la concentration létale de 50% ( $CL_{50}$ ). Cette évaluation, standardisée avec une limite de  $CE_{50} < 25 \mu\text{g/ml}$  avec un rapport  $LC_{50}/EC_{50}$  supérieur à 15, a été établie par le programme de la marine américaine comme niveau d'efficacité pour de nouveaux antifouling (Almeida et al., 2007; Thiyagarajan et al., 2004). En effet, de nombreux métabolites secondaires isolés ont été rapportés comme QSI mais également comme anti-microbiens (antibiotique ou antifongique) mettant ainsi en avant un manque de spécificité et une potentielle toxicité à haute concentration. Par exemple, certaines furanones halogénées sont toxiques pour les bactéries tels que *Staphylococcus* sp. mais également pour les animaux (Kuehl et al., 2009). De même, la patuline est une puissante mycotoxine et entraîne des problèmes gastro-intestinaux chez l'humain en cas d'ingestion (Tofan, 2012) et l'acide pénicillique est toxique pour les chiens (Hayes et al., 1977). Certains

QSI sont aussi connus pour être de puissantes toxines létales pour les microorganismes, les animaux et l'Homme. Cette toxicité des composés anti-QS souligne la nécessité d'examiner la spécificité des composés déjà isolés et de comprendre leurs mécanismes d'action avant leur utilisation.

## 4. Stratégies de la thèse

### A. Objectifs et questions de l'étude

Cette thèse a pour objectifs de comprendre la nature et l'importance des interactions microbiennes au sein de l'épimicrobiote de l'algue brune *Saccharina latissima* à travers le prisme du quorum sensing mais également de s'inspirer du dialogue moléculaire régissant les interactions entre les différents partenaires de l'holobionte algal afin de révéler de potentiels nouveaux composés antifoulings éco-compatibles. Au cours de cette thèse, les questions suivantes ont été abordées :

- Quelle est la diversité taxonomique des microorganismes de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* ? Quelle est la diversité chimique de surface de *Saccharina latissima* ? Peut-on associer des métabolites de surface à des microorganismes ou des groupes de microorganismes ?
- Comment interagissent les microorganismes à la surface de *Saccharina latissima* ? Les microorganismes de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* sont-ils capables de faire du QS ? Quelle est la place du QS dans ces interactions microbiennes et régule-t-il le microbiote de surface ?
- Ces microorganismes sont-ils capables de produire des composés antifoulings ? Peut-on isoler de nouveaux antifoulings à partir de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* ?

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux interactions au sein de l'épimicrobiote de *S. latissima*. Par des approches de métabarcoding et de métabolomique, nous avons étudié les diversités microbienne et chimique présentes au sein de l'épimicrobiote de *S. latissima* et mesuré les variations interindividuelles. Nous les avons corrélés afin de

déterminer si des microorganismes participent au métabolome de surface et s'il est possible de les identifier (**Chapitre II**). Afin d'évaluer l'impact du QS dans la régulation de la composition taxonomique de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*, nous avons suivi les communautés microbiennes et les composés associés en présence d'activateurs et d'inhibiteurs des mécanismes du QS (**Chapitre III**).

En parallèle, nous avons mené une approche culture-dépendante des microorganismes présents à la surface de *S. latissima*. Les souches fongiques isolées ont été analysées en LC-MS afin d'évaluer leur capacité à produire des médiateurs chimiques impliqués dans des interactions entre microorganismes. L'ensemble des organismes isolés ont été caractérisés pour leur capacité à faire du biofilm et du QS à l'aide de tests biochimiques (biosenseurs). Nous avons également étudié les capacités de régulation de biofilm et de quorum sensing des souches isolées à l'aide de tests biochimiques (antibiofilm et anti-QS) (**Chapitre IV**). Les souches productrices de composés anti-QS et antibiofilm ont été cultivées à grande échelle afin d'isoler spécifiquement les composés à même d'interagir avec le QS. L'analyse structurale des composés a été réalisée par RMN (**Chapitre V**)(**Figure I.17**).

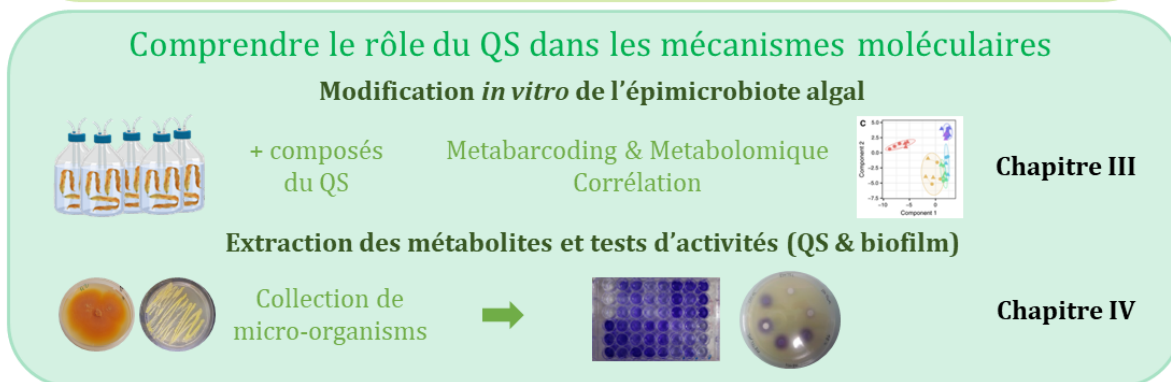
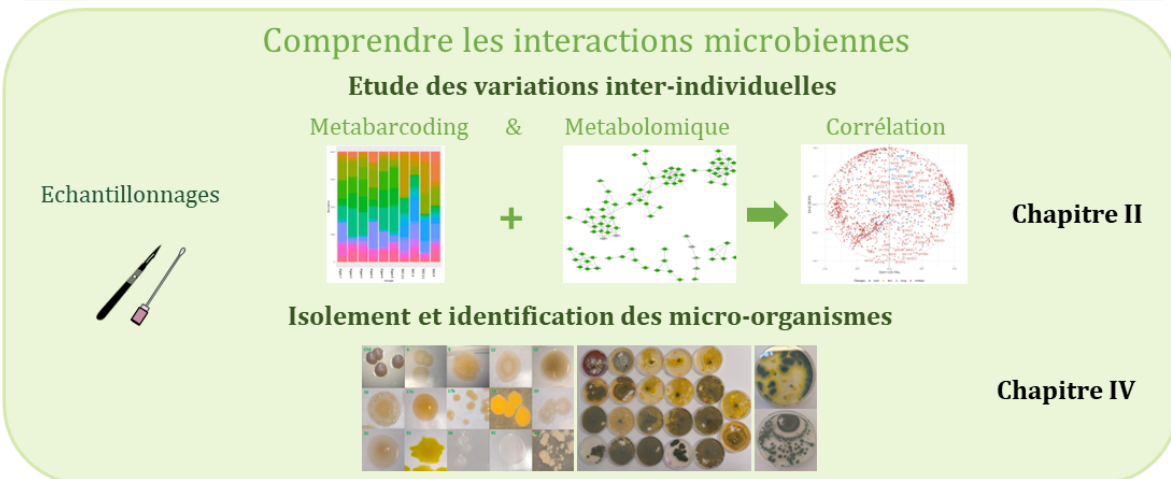
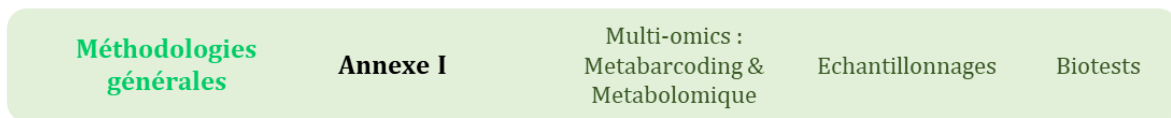
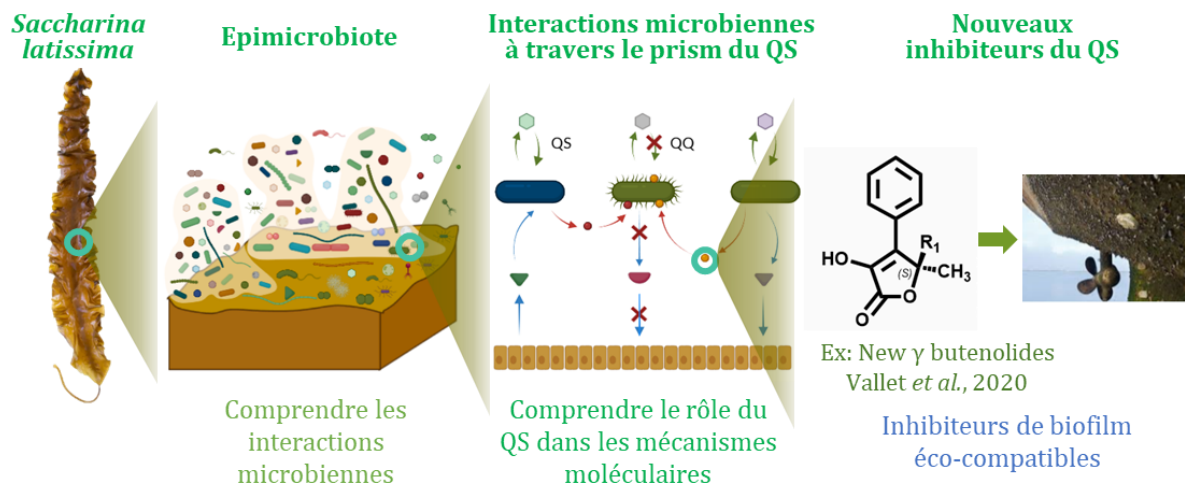


Figure I.17 : Plan schématique de l'organisation de la thèse

## B. Approches multi-omiques de la thèse

Dans ce travail de thèse, dans le but de mieux comprendre le fonctionnement de l'épimicrobiote algal de *Saccharina latissima*, nous avons opté pour deux approches principales (**Chapitre II et III**) :

- Le métabarcoding, une méthode de métagénomique ciblée sur communautés microbiennes (ici, bactéries, eucaryotes dont les champignons).
- La métabolomique non ciblée, aussi appelée méta-métabolomique lorsqu'elle est effectuée sur des échantillons environnementaux (ici le métabolome de surface).

### B.1) Metabarcoding

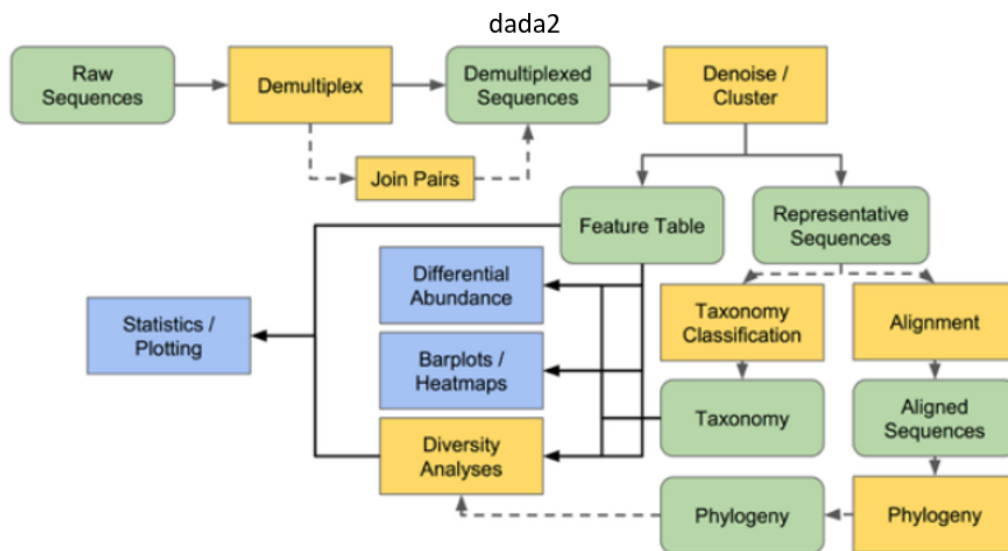
Le métabarcoding consiste à séquencer une région génomique spécifique à partir d'un échantillon environnemental. Cette technique permet notamment d'identifier et de quantifier les espèces présentes dans l'échantillon en se basant sur les séquences d'ADN obtenues. Elle est couramment utilisée en écologie pour étudier la biodiversité des communautés bactériennes, fongiques ou d'autres organismes présents dans un environnement, notamment au sein de l'holobionte. Ici, les régions du gène de l'ARNr 16S ont été séquencées afin d'identifier la diversité des communautés bactériennes, l'ARNr 18S et le fragment ITS pour identifier plus précisément la diversité des communautés eucaryotiques et fongiques présentes dans l'épimicrobiote.

#### - Workflow analytique

Les résultats de métabarcoding ont été traités avec Qiime 2 version 2022.2 (Bolyen et al., 2019). Il s'agit d'une plateforme bio-informatique gratuite et open source qui offre la possibilité d'analyser les microbiomes obtenus à l'aide des techniques de séquençage NGS. Ce processus d'analyse comprend plusieurs étapes cruciales à partir des données brutes initiales (**Figure I.18**), visant à obtenir des fichiers de sortie essentiels : une table des Amplicon Sequence Variants (ASV) par échantillon ainsi qu'une table de taxonomie détaillée des ASVs détectées. Les ASVs ont été assignés avec 99% de similarité avec les bases de données SILVA 138 (SSU Ref NR 138.1) (Pruesse et al., 2012; Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014) pour les gènes de l'ARNr 16S et 18S et avec UNITE 9 (Kõljalg et al., 2020; Nilsson et al., 2019) pour les



séquences ITS. Contrairement aux unités taxonomiques opérationnelles (OTU), qui sont généralement clustérisées avec un seuil de similarité (97 ou 99%) entre séquences, les ASVs sont plus précises et reposent sur une analyse des séquences brutes sans seuil de similarité. Chaque ASV représente ainsi une séquence unique, offrant une résolution taxonomique plus précise. Les ASV sont donc préférés lorsque la précision est essentielle, tandis que les OTU peuvent être utilisés dans des analyses exploratoires moins sensibles à la variabilité au sein des communautés microbiennes.



**Figure I.18** : Étapes du traitement des résultats de métabarcoding avec Qiime 2

Les matrices contenant les ASVs et la taxonomie sont ensuite traitées avec R (4.2.3, 2023-03-15) (R Core Team, 2023), en les exploitant avec une gamme variée de packages tels que phyloseq (v.1.40.0), ggplot (v.3.4.0), et microbiome (v1.18.0)(Lahti and Shetty, 2017; McMurdie and Holmes, 2015, 2013). Cette approche analytique permet de générer des barplots qui représentent graphiquement les organismes microbiens présents dans les échantillons. De plus, la diversité  $\alpha$ , mesurant la diversité des espèces au sein d'un échantillon, peut être évaluée. De manière complémentaire, la diversité  $\beta$ , examinant les différences entre les communautés microbiennes entre différents échantillons, peut également être calculée pour fournir une compréhension approfondie des variations microbiennes entre les groupes d'échantillons. Des analyses statistiques univariées ou multivariées peuvent également être effectuées sur les jeux de données.

## B.2) Métabolomique

La métabolomique non ciblée constitue une approche analytique visant à détecter l'ensemble des métabolites présents au sein d'un échantillon biologique (de tissus ou de biofilms) (Kuhlisch and Pohnert, 2015). Pour atteindre cet objectif, diverses méthodes analytiques sont mises à disposition, parmi lesquelles la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) qui joue un rôle central en matière d'identification et de prépondérances de ces métabolites (choix technique sélectionné dans ce travail de thèse).

La chromatographie en phase liquide (Liquid Chromatography - LC) est une technique analytique essentielle employée pour fractionner les composés au sein d'un mélange complexe. Elle repose sur la séparation des espèces chimiques en fonction de leur polarité au sein d'une colonne, en utilisant une phase mobile liquide pour les déplacer à travers une phase stationnaire. Chaque molécule présente un temps d'élution spécifique en fonction de son affinité respective pour ces deux phases. La chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) peut être mise en œuvre de deux manières : soit en utilisant une phase stationnaire polaire (HPLC dite en phase normale), soit en employant une phase stationnaire apolaire (HPLC en phase inverse, effectuée ici). Dans le contexte de la phase inverse, les analytes sont élués dans l'ordre décroissant de leur polarité.

L'analyse d'une molécule par spectrométrie de masse est un processus séquentiel comprenant plusieurs étapes distinctes : premièrement, l'analyte est ionisé au sein de la source d'ionisation, ensuite les ions résultants sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) au sein de l'analyseur de masse, suivant quoi les ions séparés sont détectés. Finalement, les données obtenues sont présentées sous la forme d'un spectre, où l'axe des abscisses représente le rapport  $m/z$  et l'axe des ordonnées reflète l'intensité du signal. La spectrométrie de masse en tandem MS/MS ( $MS^2$  ou  $MS^n$ ), permet l'obtention d'ions fragments issus de la dissociation d'ions parents offrant ainsi des informations plus détaillées sur leur structure et leur composition.

## - Workflow analytique

Afin d'analyser la composition et d'identifier les molécules détectées en LC-MS/MS, un workflow analytique a été mis en place (**Figure I.19**). Ce workflow implique plusieurs étapes cruciales de traitement des spectres à l'aide du logiciel MzMine 3 (version 3.2.8) (Pluskal et al., 2010; Schmid et al., 2023). Après conversion des fichiers de LC-MS/MS en .mzXML, les masses des spectres MS et MS2 sont détectées, tout en éliminant le bruit de fond assurant ainsi la fiabilité des données. Ensuite, les spectres sont soumis à un traitement supplémentaire avec les modules « ADAP chromatogram builder » et « ADAP chromatogram resolver », qui permettent la construction et la résolution de chromatogrammes pour une identification plus précise des composés détectés (Myers et al., 2017). Les isotopes sont éliminés à l'aide du filtre « <sup>13</sup>C isotope filter ». Par la suite, une étape d'alignement des chromatogrammes, réalisée avec l'algorithme « RANSAC aligner », est exécutée entre les échantillons pour assurer une cohérence dans les données. En parallèle, une soustraction est effectuée pour éliminer les contributions du blanc dans la matrice de données. Cette étape est d'une importance cruciale pour ne conserver que les composés d'intérêt, par exemple, ceux produits par un champignon (en éliminant les signaux provenant du milieu de culture) ou ceux issus de l'épimicrobiote algal (en excluant les composés de l'eau de mer et les éventuelles sources de contamination expérimentales). Le blanc est ainsi soumis aux mêmes traitements que tous les autres échantillons. Enfin, une étape de "Gap-filling" est effectuée avant l'exportation de la matrice de données afin de supprimer toute valeur manquante dans la matrice. Les paramètres spécifiques pour le traitement avec MzMine 3 doivent être ajustés en fonction du jeu de données et sont dépendants du nombre d'échantillons et de la qualité des spectres. Les informations détaillées concernant les paramétrages MzMine 3 figurent dans les matériels et méthodes de chaque chapitre. L'outil exportation permet d'extraire plusieurs types de matrices dont un fichier en .mgf qui contient toutes les informations sur les composés et leur fragmentation (données MS et MS2) et deux tableaux essentiels un .csv et un \_quant.csv qui permettent d'obtenir les *m/z*, les temps de rétention et leur intensité (quantification relative) pour chaque métabolite détecté par échantillons (données de MS). Ces différentes matrices sont essentielles pour la suite des analyses.

Dans le domaine de la métabolomique, l'identification précise des composés est une étape cruciale, mais souvent laborieuse. Cette identification repose sur la comparaison des

données expérimentales avec des bases de données de produits naturels de référence contenant des informations sur les masses, les temps de rétention et, parfois, les fragments caractéristiques attendus des métabolites. Plusieurs bases de données, telles que Lotus, NpAtlas et MarinLit, sont disponibles à cette fin, cependant, ce processus peut-être fastidieux, car il nécessite souvent une recherche manuelle des masses ( $m/z$ ) correspondantes (Rutz et al., 2022; van Santen et al., 2019; van Santen et al., 2022). Heureusement, des avancées dans les logiciels d'analyse ont simplifié cette tâche. Par exemple, le logiciel Sirius peut utiliser les spectres de fragmentation et les  $m/z$  pour déterminer les formules brutes des composés détectés, leurs adduits, leur famille moléculaire et parfois même leur voie de biosynthèse (Djombou Feunang et al., 2016; Dührkop et al., 2019; Hoffmann et al., 2021; Kim et al., 2021; Ludwig et al., 2020). Connecté à des bases de données en ligne, Sirius peut proposer plusieurs annotations, à partir de fragmentation *in silico* et avec un score de fiabilité, améliorant ainsi l'efficacité de l'identification. La plateforme web GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking) possède également des outils d'annotation comme *Library search, in silico tools, Dereplicator* and *Dereplicator +* (Mohimani et al., 2018).

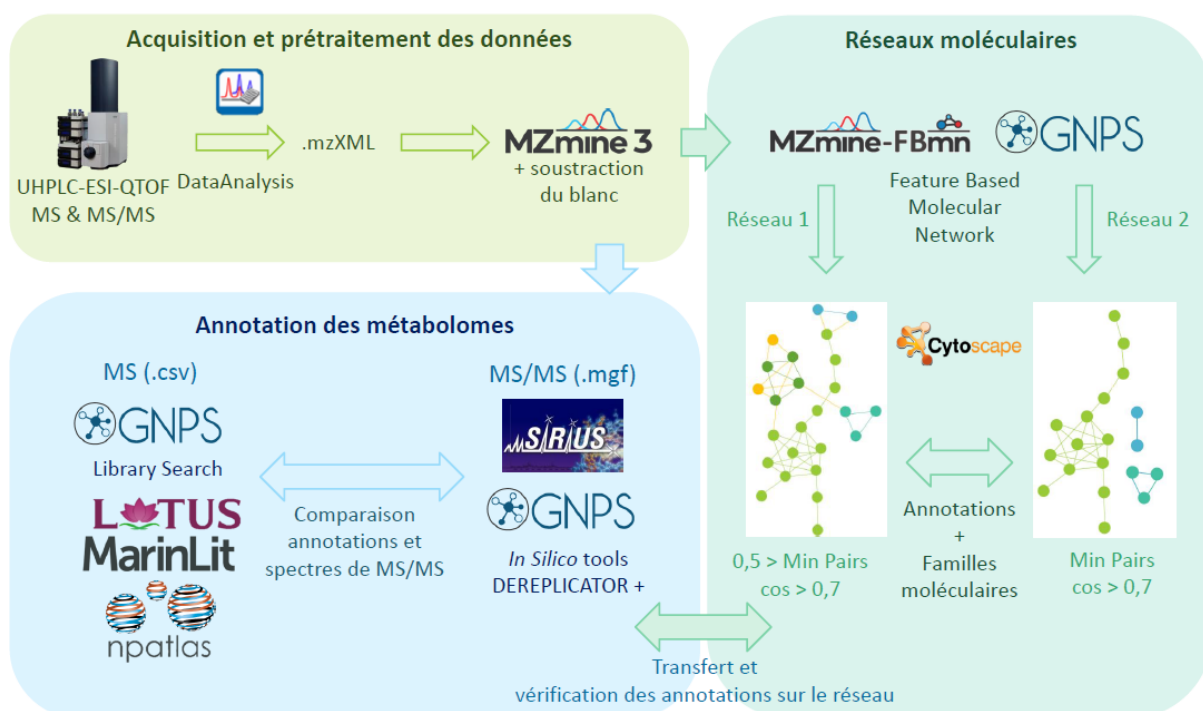


Figure I.19: Représentation schématique du workflow effectué sur les données de LC-MS/MS

Parallèlement à cette approche, une méthodologie basée sur les réseaux moléculaires a été mise en œuvre grâce à la plateforme GNPS via l'outil Feature-Based Molecular Networking (FBMN). Cette approche repose sur les similarités entre les spectres de

fragmentation et les pertes de neutrons, ce qui permet de regrouper les métabolites en clusters ou groupes similaires (Nothias et al., 2020; M. Wang et al., 2016). GNPS répertorie les connaissances sur des spectres de MS/MS expérimentaux préalablement analysés, ce qui facilite l'annotation de composés directement au sein du réseau et permet de proposer des analogues structuraux. À partir de ces annotations, il est possible d'aller plus loin en réalisant des annotations par propagation. Cette étape consiste à utiliser les différences entre les formules moléculaires des composés, en combinant des données provenant d'outils tels que Sirius et GNPS. La construction de ces réseaux moléculaires dépend étroitement des paramètres sélectionnés pour leur élaboration, ce qui offre une grande flexibilité dans l'analyse. Par conséquent, il est possible de générer plusieurs réseaux moléculaires à partir des mêmes données en ajustant ces paramètres selon les besoins spécifiques. Par exemple, on peut créer un réseau avec des paramètres de similarité stricts ( $\text{Min Pairs Cos} > 0.7$ ) pour regrouper des métabolites très similaires, tandis qu'un autre réseau peut être généré avec des paramètres plus larges ( $0.5 > \text{Min Pairs Cos} > 0.7$ ) pour inclure des métabolites moins similaires. De plus, le nombre de fragments en commun requis entre deux composés peut également être modifié pour élargir les clusters (par exemple, passer de 6 à 4 fragments en commun). Ces ajustements permettent d'améliorer la résolution des clusters, d'annoter plus facilement et d'obtenir des regroupements plus pertinents. Une fois les réseaux générés, la visualisation, mise en forme et la modification sont possibles grâce au logiciel Cytoscape (3.10.1)(Shannon et al., 2003). Des statistiques peuvent également être effectuées en calculant l'abondance relative de chaque métabolite. Les données ainsi obtenues sont soumises à des analyses statistiques univariées, ou multivariées permettant de corrélérer différents jeux de données.

## Chapitre II. Diversités microbiennes et métabolomes de surface de *S. latissima*





## Avant-Propos

Au cours de ce chapitre, par des approches de métabarcoding et métabolomique non ciblée, nous avons étudié les diversités microbienne et chimique présentes au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*. Par des approches de corrélation, nous avons mesuré les variations interindividuelles pour explorer les liens écologiques entre métabolome et microbiote de surface de *S. latissima*.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article de recherche soumis dans la revue *Metabolomics* de Springer. Les références bibliographiques citées dans cet article sont indexées à la fin du manuscrit. Les figures supplémentaires se trouvent dans la partie **Annexes du Chapitre II**. Toutes les figures, figures supplémentaires et tableaux figurent en également sous format électronique, la liste des figures et des légendes se trouvent dans la partie **Annexes électroniques du Chapitre II**.





# Article: Multi-Omics Analysis of the Microbiome and Metabolome of *Saccharina latissima* (Laminariales, Phaeophyceae) Surface.

Emilie Adouane<sup>1,2</sup>, Cédric Hubas<sup>3</sup>, Catherine Leblanc<sup>4</sup>, Raphaël Lami<sup>2\*\*</sup> and Soizic Prado<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Muséum National d'Histoire Naturelle, Unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-Organismes, UMR 7245, CNRS, Sorbonne Université, Paris, France*

<sup>2</sup>*Sorbonne Université, CNRS, UAR 3579 Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France*

<sup>3</sup>*Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire Biologie des Organismes et Écosystème Aquatiques (UMR 8067 BOREA), Sorbonne Université, CNRS, IRD, Université de Caen Normandie, Université des Antilles, Station Marine de Concarneau, Quai de la croix, 29900 Concarneau, France*

<sup>4</sup>*Biologie Intégrative des Modèles Marins, LBI2M (Sorbonne Université/CNRS), Station Biologique de Roscoff (SBR), 29680 Roscoff, France.*

*\*co-last authors*

*† : corresponding authors: [soizic.prado@mnhn.fr](mailto:soizic.prado@mnhn.fr) and [raphael.lami@obs-banyuls.fr](mailto:raphael.lami@obs-banyuls.fr)*

## Keywords

Brown macroalgae, holobiont, epiphytic community, metabolomics, metabarcoding

## Abstract

The microbiome of *Saccharina latissima*, an important canopy-forming brown macroalgal species in Europe, significantly influences its overall health, fitness, and ability to fight pathogens. However, in-depth studies of the diversity and function of the microbial communities (bacteria, eukaryotes, and fungi) associated with this macroalgal species are scarce. We conducted a study focusing on the microbial community (using metabarcoding) associated with *S. latissima* epimicrobiota and correlated their microbial diversity with metabolomic patterns (LC-MS/MS). Surface metabolomes were annotated by extensive searches of NP databases. Some epibacterial and eukaryotic communities are specific to *S. latissima* surface and that a core microbiota is present. In contrast, the fungal communities showed a lower and more heterogeneous diversity. Metabolomic analysis revealed a large diversity of metabolites, including putatively annotated fatty acids, amino derivatives, amino acids, and naphthofurans, which also form a subset of these metabolites. To tentatively correlate the surface metabolome and microbial diversity, we implemented a multiple-factor analysis, permitting the establishment of correlations between datasets. Our results revealed that fungi and bacteria were responsible for the main variations in the metabolomes of the epiphytic community. By comparing individuals, we were able to highlight two groups of different taxa, one associated with a bacterial consortium and the other with a fungal consortium, covarying with specific metabolites, providing a snapshot of the algae-based microbial chemical interactions. Our approach enabled us to demonstrate the existence of functional groups within the epimicrobiota of *S. latissima* and establish a link between the structure of the microbial community and their putative functions.

## Introduction

Brown macroalgae, particularly the Laminariales, are important primary producers and habitat-forming species in temperate coastal ecosystems. *Saccharina latissima* (Linnaeus) CE Lane, C. Mayes, Druehl and GW Saunders, is one of the main species of kelp-forming beds in Europe. They are nutrient sources for many organisms and significantly affect biodiversity (D. Schiel and Lilley, 2007; Schiel and Foster, 2006). Macroalgae interact closely with the microbial communities they harbor (bacteria, fungi, viruses, and archaea). Interactions between algal hosts and their associated microbiota constitute a singular entity, termed the algal holobiont (Egan et al., 2013; Wahl et al., 2012). These interactions are regulated by the production of chemicals that may impact the composition of the host (Coelho-Souza et al., 2017; Dittami et al., 2016; Goecke et al., 2010). Two communities coexist on the alga: one living on the surface, the epiphytes, and the internal communities, called endophytes. The algal epimicrobiota is a biofilm-like epimicrobiota known as the 'second skin' (Wahl et al., 2012), which is the site of chemical and ecological interactions (Egan et al., 2013). Overall, our understanding of the diversity of colonizing microbes and their ecological roles as well as how they interact among themselves and with their hosts remains limited.

Previous studies were carried out on epimicrobiota in Laminariales species, including *Laminaria hyperborea* (Bengtsson and Øvreås, 2010) and *Laminaria digitata* (Ihua et al., 2020). However, little is known about the *Saccharina latissima* microbiota. Notably, the total bacterial diversity has been described by (Burgunter-Delamare et al., 2023), (Davis et al., 2023), and (Tourneroché et al., 2020). The fungal diversity associated with macroalgae has been less explored despite its proven ecological significance. Indeed, Vallet et al. (2018), highlighted the crucial role played by the metabolites of endophytic fungi associated with 4 species of brown algae (*Laminaria digitata*, *Saccharina latissima*, *Ascophyllum nodosum* and *Pelvetia caniculata*) against protist pathogens (Vallet et al., 2018). Although several studies have focused on the role and diversity of endophytic fungal communities (Debbab et al., 2012; Harvey and Goff, 2010; Tourneroché et al., 2020), epiphytic fungal diversity remains largely unexplored, with only one study focusing on the epiphytic fungi of *Saccharina latissima* (Chen et al., 2022). To the best of our knowledge, this is the first comprehensive investigation of epiphytic fungal communities using metabarcoding.

Microorganisms in algal holobionts have strong multidirectional interactions that rely on the production of chemical signals (Egan et al., 2013; Goecke et al., 2010; Harder et al., 2012). However, our understanding of the surface-mediated signaling processes and the nature of the chemical mediators is still very limited owing to methodological difficulties, such as the low concentration and water diffusion of the compounds. Metabolomics is an emerging multi-omics approach that enables the qualitative and quantitative analysis of the metabolites in a sample at a given time (Johnson et al., 2016; Parrot et al., 2019). Its application in determining the kelp surface metabolome, which can originate from both the surface microbiota and algae, can provide information on their putative interactions. Some metabolomes have already been mapped, notably that of *Fucus* sp. (Parrot et al., 2019; Rickert et al., 2016) and of *Taonia atomaria* (Othmani et al., 2016a; Paix et al., 2021a, 2020, 2019). Multi-omics studies (metabarcoding and metabolomics) on *Taonia atomaria* have revealed that the associated epibacterial communities are highly specific to the algal host and that holobiont dynamics vary seasonally. In this study, summer-dominant bacteria were positively correlated with known antifouling metabolites such as dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and proline (Paix et al., 2019).

This study aimed to address the ecological question of links between the surface metabolome and surface microbiota, including any chemicals that may be involved in the host's defense mechanisms. To do so, multi-omics analysis was performed to characterize the epimicrobiota composition of *Saccharina latissima* along with its surface metabolome, and to correlate variations in the metabolome with the microbial communities. This enabled us to demonstrate the presence of a core bacterial and eukaryotic microbiota associated with a core metabolome, along with interindividual variations within the algal epimicrobiota.

## Materials and Methods

### Epimicrobiota sampling from *Saccharina latissima*

Young *Saccharina latissima* (Laminariales, Phaeophyceae) (<1 m) were harvested at Perharidy (48°43'47.0" N 4°00'17.1" W), Roscoff (Brittany, France), in June 2021 at low tide. Six healthy (without visible damages) macroalgae were randomly selected, collected, and placed in sterile plastic bags. A total of 6 individuals were quickly transported to the laboratory in a cooler, at a temperature of about 4 °C, and then placed in a cold room while waiting for

the samples (maximum 2 h) (Burgunter-Delamare et al., 2022). After rinsing each alga with sterile seawater, 5 cm high areas were delineated along the thallus of each individual (6 areas in total per individual corresponding to 120 cm<sup>2</sup>) (Bengtsson and Øvreås, 2010) (**Supp. Fig II.1**). These areas were extracted using two methods: one to obtain the surface microbiota and the other to obtain the surface metabolome. The surface microbiota were retrieved by scraping the algae with a scalpel and swabbing. The swabs (1 per individual) were then placed in 2 ml Eppendorf tubes containing sterile seawater and vortexed for 2 min. The surface metabolome were retrieved by scraping the alga with a scalpel and placed in 2 ml of MeOH (1 sample per individual). During sampling, 2 L of seawater samples were taken and filtered on 8 µm and 0.2 µm filters each and used as controls for the metabarcoding. The negative control for metabarcoding consisted of a sterile seawater sample into which a scalpel was dipped, and a swab was introduced. The sterile seawater control in which a scalpel was dipped was also used for the metabolomics method. The samples were then frozen at -20 °C pending DNA extractions and mass spectrometry.

### **Extraction of total DNA from the algal epimicrobiota**

The microbial samples (swabs and filters) were vortexed and transferred into a Lysing Matrix E tube of the FastDNA™ SPIN kit for Soil (M.P. Biomedicals). DNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions without any modifications. The extracted DNA was quantified using a Quantus fluorometer (Promega), and its quality was checked using a DeNovix DS-11 FX+ Spectrophotometer/Fluorometer.

### **Identification of the microbial communities by Illumina MiSeq-based high-throughput sequencing**

For amplification of the 16S and 18S rRNA genes, the prokaryotic primers U341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') and U806R (5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3'); and eukaryotic primers Eu565F (5'-CCAGCASCYGC GGTAATTCC-3') and Eu981R (5'-ACTTTCGTTCTTGATYRATGA-3') were used. PCR amplifications were performed (1µl DNA-Input; 30 cycles; 1kb ladder) according to the routine protocols of LCG Genomics GmbH (Berlin, Germany, <http://www.lcggroup.com/>, <http://www.biosearchtech.com/>). Because of the presence of PCR inhibitors, the samples were diluted 1:10. The quality of the PCR

amplifications was verified using gel electrophoresis (2 % agarose). For the fungal sequences (ITS1 sequences), the primers ITS1F-Kyo2 (5'-TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA-3') and ITS86R (5'-TTCAAAGATTTCGATGATTCAC-3') were first used to avoid amplification of the plant and algal DNA, but no amplicon was obtained, even after dilution of the samples. The primers ITS7F (5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3') and ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') targeting ITS2 were used. The DNA samples were not diluted, and the quality of the PCR amplifications was checked by gel electrophoresis (2 % agarose).

MiSeq paired-end sequencing (2 × 300 bp) of the 16S rRNA, 18S rRNA, and ITS2 sequences was performed using Illumina MiSeq V3 with 2.5 million reads. The resulting FASTQ files were analyzed using QIIME 2 (2022.2) (Bolyen et al., 2019) following the workflow established in the laboratory by (Romani et al., 2021). Briefly, the barcodes and primers were removed by cutting adaptation (Martin, 2011). The sequences were denoised, dereplicated, and matched using DADA2 (Callahan et al., 2016). Subsequently, the obtained amplicon sequence variants (ASVs) were assigned to a 99 % sequence similarity with VSEARCH (Rognes et al., 2016) using the SILVA 138 database (SSU Ref NR 138.1) (Pruesse et al., 2012; Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014) for the 16S and 18S rRNA genes and the UNITE 9 database (Kõljalg et al., 2020; Nilsson et al., 2019) for ITS2. No DNA sequences from the negative control swab in sterile seawater were amplified; thus, this technical control was not included in further analysis. Subsequently, rarefaction curves were obtained, the ASVs tables were rarefied, and undesirable taxa were eliminated (mitochondria, chloroplasts, and eukaryotes for the bacterial sequences; bacteria, archaea, and vertebrates for the eukaryotic sequences; and mitochondria, chloroplasts, and eukaryotes for the fungal sequences).

The ASVs tables were then exported and the results were processed using Rstudio (4.2.3, 2023-03-15) (R Core Team, 2023) with the library *phyloseq* (v.1.40.0), *ggplot2* (v.3.4.0), *vegan* (v.2.6.4), *dplyr* (v.1.0.10), *scales* (v.1.2.1), and *reshape2* (v.1.4.4) (McMurdie and Holmes, 2015, 2013) on the following GitHub available workflow <https://joey711.github.io/phyloseq/>. The core microbiota was identified using the *microbiome* (v1.18.0) library (Lahti and Shetty, 2017) (<http://microbiome.github.com/microbiome>). The  $\alpha$ -diversity indexes (Chao1, Simpson's, and Shannon) values were calculated with R, and the bar plots and statistical analyses (Mann-

Whitney test) were constructed and performed, respectively, with GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software, LLC, Boston, USA).

## **Metabolites extraction and LC-MS analysis**

Samples (6) from the methanol-soaked scalpel scraping and controlled samples were filtered, evaporated, resolubilized in methanol, filtered, and dried again to remove the salt. They were then solubilized in methanol at 10 mg.mL<sup>-1</sup> and analyzed using HPLC-MS/MS in one batch and a random sequence, following previously established laboratory protocols (Tourneroché et al., 2020; Vallet et al., 2018). The separation occurred onto a C18 Acclaim™ RSLC PolarAdvantage II column (2.1 × 100 mm, 2.2 μm pore size; Thermo Fisher Scientific, United States) connected to a Dionex Ultimate 3000 HPLC system and coupled to a Maxis IITM QTOF mass spectrometer (Bruker, United States) with an electrospray ionization source. The MS parameters were as follows: 3.5 kV of electrospray voltage, 35 psi of nebulizing gas (N<sub>2</sub>) pressure, drying gas (N<sub>2</sub>) flow rate of 8 L.min<sup>-1</sup>, and 200 °C of drying temperature. The mobile phases used were water (0.1 % formic acid) and acetonitrile (0.1 % formic acid, solvent B), following a gradient of B at 5, 50, 90, and 5 % for 0, 9, 15, and 21 min, respectively.

The LC-MS/MS data were analyzed using DataAnalysis (version 4.4 Bruker Daltonik GmbH) and converted to “. mzXML.” The LC-MS/MS data were preprocessed on MzMine 3.2.8 (Pluskal et al., 2010; Schmid et al., 2023) with a noise level of 1E3 for MS1 and 2E1 for MS2, and the ADAP chromatogram was built with a minimum group size of a scan of 2, a group intensity threshold, and minimum highest intensity at 1E3 (Myers et al., 2017). The chromatograms were resolved with ADAP Module Disclaimer with the S/N threshold at 10, minimum feature height at 1, coefficient/area threshold at 10, 0.02–1.00 for the peak duration range, and 0.10-0.50 for the RT wavelet range. The data were then de-isotoped and filtered to retain only the peaks with MS2 scans, and RANSAC alignment was performed. After the alignment, the blank was subtracted from the matrix. This step eliminated any compounds that may have resulted from external contamination during the experiment. The data were exported to FBMN-GNPS to build a molecular network with a cosine of 0.6 and four minimum matched fragment ions, precursor ion mass tolerance, and fragment ion mass tolerance at 0.05 Da (Nothias et al., 2020; M. Wang et al., 2016). The metabolites were annotated using various GNPS tools, including Library Search, Dereplicator, Dereplicator + (Mohimani et al.,



2018), and Sirius 5.6.3 (Dührkop et al., 2019) using molecular formula identification, ZODIAC, CSI:FingerID, and CANOPUS (Djoumbou Feunang et al., 2016; Dührkop et al., 2021, 2015; Hoffmann et al., 2021; Kim et al., 2021; Ludwig et al., 2020). Furthermore, the  $m/z$  values and mass formulas were searched and annotated using the natural products databases NPAtlas, MarinLit, and LOTUS (Rutz et al., 2022; van Santen et al., 2019; van Santen et al., 2022). The annotations were added to the network using the Cytoscape 3.10.0 software (Shannon et al., 2003). The core metabolome, that is, the abundance and prevalence of redundant metabolites in the samples, was calculated from the MS data using the same R package as the metabarcoding data (see above).

## Integration of the Surface Metabolome and Surface Microbiota

### Datasets: Multi-omics approach

The LC-MS metabolomics (features) and metabarcoding (bacterial, eukaryotic, and fungal ASVs) data for each *Saccharina latissima* epimicrobiota sample (epimicrobiota 1–6) were correlated. A multiple-factor analysis (MFA) was performed using Rstudio (4.2.3, 2023-03-15) (R Core Team, 2023) with the FactoMineR and factoextra packages (Pagès, 2014).

## Results

### Bacterial diversity within the epimicrobiota of *S. latissima*

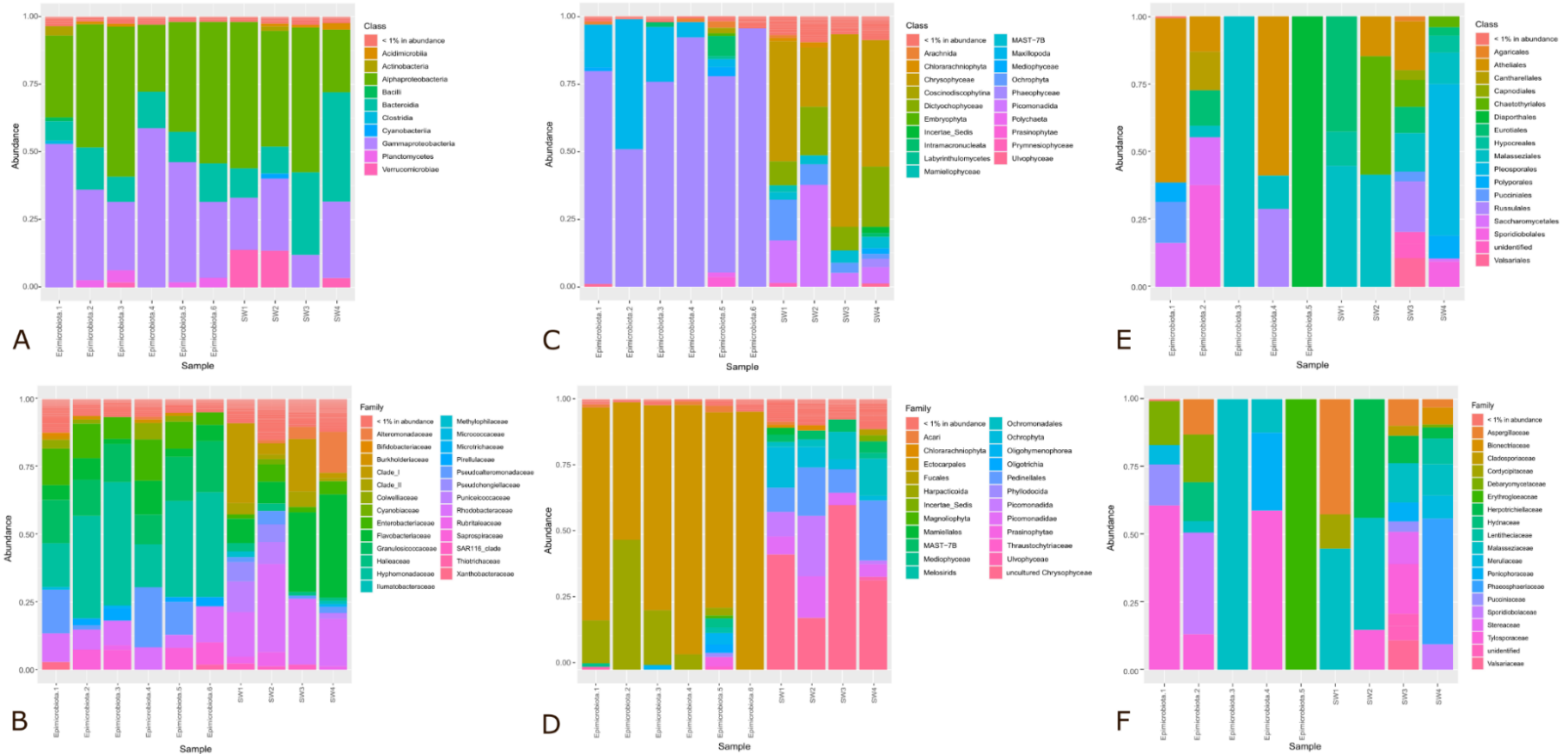
The bacterial diversity of the *S. latissima* epimicrobiota was analyzed using 16S rRNA sequencing and compared with the composition of the four seawater samples. No DNA sequences were amplified from the negative control swabs in sterile seawater. The percentage of unassigned sequences in the rRNA 16S dataset was 17–43 % (**Supp. Figure II. 2A**), corresponding to the algal mitochondrial sequences (data not shown). Percentages of abundance were calculated by excluding these sequences.

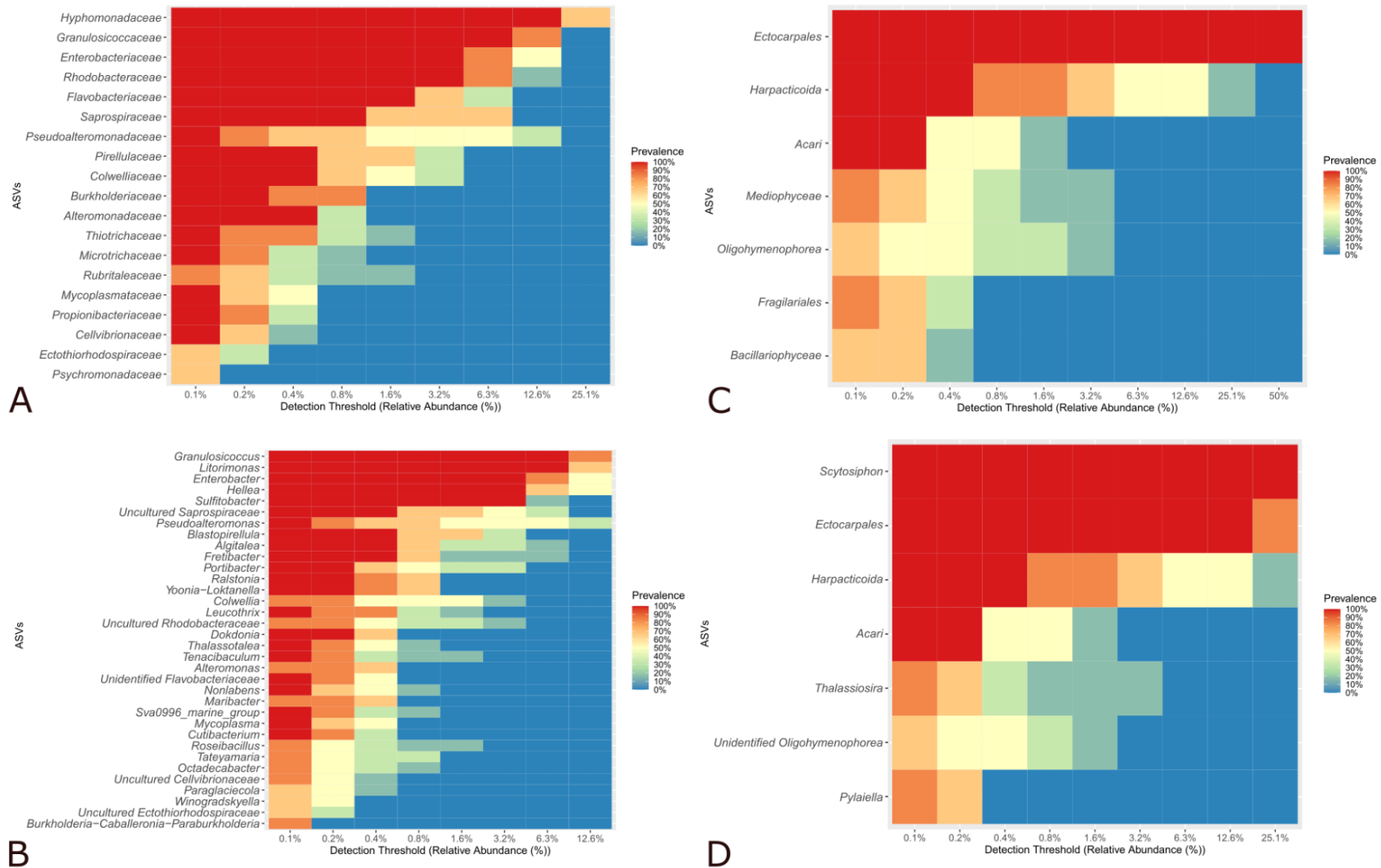
Overall, high microbial diversity was observed in our samples, with 683 assigned ASVs (**Supp. Table II.1A**). Our results showed that the algal epimicrobiota was mainly composed of Alphaproteobacteria (25–56 % of the total abundance), Gammaproteobacteria (25–59 %), and Bacteroida (7–16 %). At this taxonomic level, the seawater was composed of similar proportions of Alphaproteobacteria (23–54 %), Gammaproteobacteria (25–59 %), and 10–40 % Bacteroidetes (**Figure II.1A**). Within the algal epimicrobiota, the family Hyphomonadaceae

was particularly present (16–46 % of total abundance) and diversified (11 ASVs), notably with *Hellea* sp., *Litorimonas* sp. and *Fretibacter* sp. (**Figure II.1B** and **Supp. Figure II.3A**). Enterobacteriaceae (*Enterobacter* sp.) (3 ASVs), Granulosicoccaceae (*Granulosicoccus* sp.) (4 ASVs), Flavobacteriaceae (41 ASVs), Saprospiraceae (*Portibacter* sp.) (9 ASVs), Rhodobacteraceae (*Sulfitobacter* sp.) (34 ASVs), and Pseudoalteromonadaceae (*Pseudoalteromonas* sp.) (3 ASVs) were also particularly abundant. In contrast, the following families were barely present in the seawater samples: Hyphomonadaceae (>1 %, 7 ASVs), Enterobacteriaceae (1–6 %, 2 ASVs), Granulosicoccaceae (0 %, 3 ASVs), and Pseudoalteromonadaceae (1–5 %, 3 ASVs). The seawater was mainly composed of Rhodobacteraceae (16–32 %, 56 ASVs), Flavobacteriaceae (8–38%, 53 ASVs), and the SAR116 Clade (2–29 %, 6 ASVs) (**Figure II.1B**).

The  $\alpha$ -diversity indices (Chao1, Shannon, and Simpson's) were calculated for the algal epimicrobiota and seawater samples (**Supp. Figure II.4A**). The Chao1 index ranged from 103 to 195 (mean  $133\pm34$ ) for the algal epimicrobiota and from 178 to 300 (mean  $242\pm50$ ) for the seawater. The Shannon index ranged from 2.9 to 3.5 (mean  $3.08\pm0.17$ ) for the algal epimicrobiota and from 3.2 to 3.9 (mean  $3.57\pm0.34$ ) for the seawater. The calculation of the Chao1 and Shannon indices showed that the bacterial diversity of seawater was significantly higher than that of the algal epimicrobiota ( $p$ -value =0.019 and  $p$ -value =0.038, Mann-Whitney test). However, Simpson's index of  $0.915\pm0.009$  for the algal epimicrobiota and  $0.929\pm0.023$  for the seawater showed that the species composition was not significantly different ( $p$ -value =0.476, Mann-Whitney test).

Subsequently, the core bacterial microbiota, that is the number of ASVs common to all the algal epimicrobiota and their relative abundances, were determined (**Figure II.2A** and **Figure II.2B**). The core surface microbiota of *S. latissima* comprised Hyphomonadaceae (12.6 %), *Hellea* sp. (3.2 %), *Litorimonas* sp. (6.3 % and 0.4 %), Granulosicoccaceae (6.3 %), *Granulosicoccus* sp., Enterobacteriaceae (3.2 %), *Enterobacter* sp., Rhodobacteraceae (3.2 %), and *Sulfitobacter* sp. Thus, 25 % of the surface microbiota was represented by four families and five genera.





**Figure II.2:** Heatmap of core microbiota within *S. latissima* epimicrobiota **(A)** Bacterial core microbiota at the Family level **(B)** Bacterial core microbiota at the Genus level **(C)** Eukaryotic core microbiota at the Family level **(D)** Eukaryotic core microbiota at the Genus level.

## 18SrRNA-based analysis of eukaryotic diversity within the epimicrobiota of *S. latissima*

The eukaryotic diversity of the *S. latissima* epimicrobiota was analyzed using 18S rRNA gene sequencing. The percentage of unassigned sequences in the rRNA 18S dataset was 14–21 % for the seawater samples and 38–91 % for the algal epimicrobiota samples (**Supp. Figure II.2B**). Percentages of abundance were calculated by excluding these sequences. The results showed that the eukaryotic populations present in the epimicrobiota and seawater were diverse (176 ASVs in total; **Supp. Table II.1B**). The detected sequences were predominantly in both the epimicrobiota and seawater, affiliated with the phylum Ochrophyta (48–96 %, 30 ASVs). However, the species composition within this phylum differed between the seawater and epimicrobiota samples. The eukaryotic epimicrobiota (**Figure II.1C and Figure II.1D**) was composed of macroalgal spores belonging to the Ectocarpales family (50–95 %, 5 ASVs), especially the *Scytosiphon* sp. (27–49 %) and *Ectocarpales* sp. (8–42 %) genus but also to Arthropoda (*Harpacticoida* sp., 2 ASVs), Diatomea (*Thalassiosira* sp., 1 ASVs) and Ciliophora (*Pseudovorticella* sp., 2 ASVs) (**Supp. Figure II.3B**). The seawater was composed of numerous unicellular algae of the Pedinellales family (9–22 %, 2 ASVs), Ochlorophyta (*Bolidomonas* sp., 19–60 %, 4 ASVs), Ochromonadales (2–14 %, 4 ASVs), Picozoa phylum with Picomonadida (0.7–22 %, 1 ASVs), and Picomonas (5–15 %, 2 ASVs) families.

The  $\alpha$ -diversity indices (Chao1, Shannon, and Simpson's) were calculated for the algal epimicrobiota and seawater samples (**Supp. Figure II.4B**). The Chao1 index ranged from 8 to 40 (mean  $24 \pm 11$ ) for the algal epimicrobiota populations and from 44 to 73 (mean  $60 \pm 14$ ) for those collected from the seawater. The Shannon index ranged from 1.16 to 2.07 (mean  $1.46 \pm 0.34$ ) for the samples retrieved from the algal epimicrobiota and from 1.77 to 2.58 (mean  $2.43 \pm 0.37$ ) for those issued from the seawater. Calculation of the Chao1 and Shannon indices revealed that the eukaryotic diversity of seawater populations is significantly higher than that of algal epimicrobiota populations ( $p$ -value = 0.0095 and  $p$ -value = 0.019, respectively, Mann-Whitney test). However, the Simpson's index of  $0.69 \pm 0.075$  for the algal epimicrobiota communities and of  $0.78 \pm 0.10$  for the seawater showed that the species composition is similar between the two types of samples ( $p$ -value = 0.257, Mann-Whitney test). Subsequently, the core eukaryotic microbiota was identified (**Figure II.2C and Figure II.2D**). The core surface

eukaryotic microbiota of *S. latissima* was composed of the Ectocarpales family (50 %), Scytosiphon spp. (25.1 %), and Ectocarpales spp. (12.6 %). Harpacticoida (0.4 %) and Acari (0.2 %) families were also present but in lower abundance.

### **ITS-based analysis of the fungal diversity within the *S. latissima* epimicrobiota**

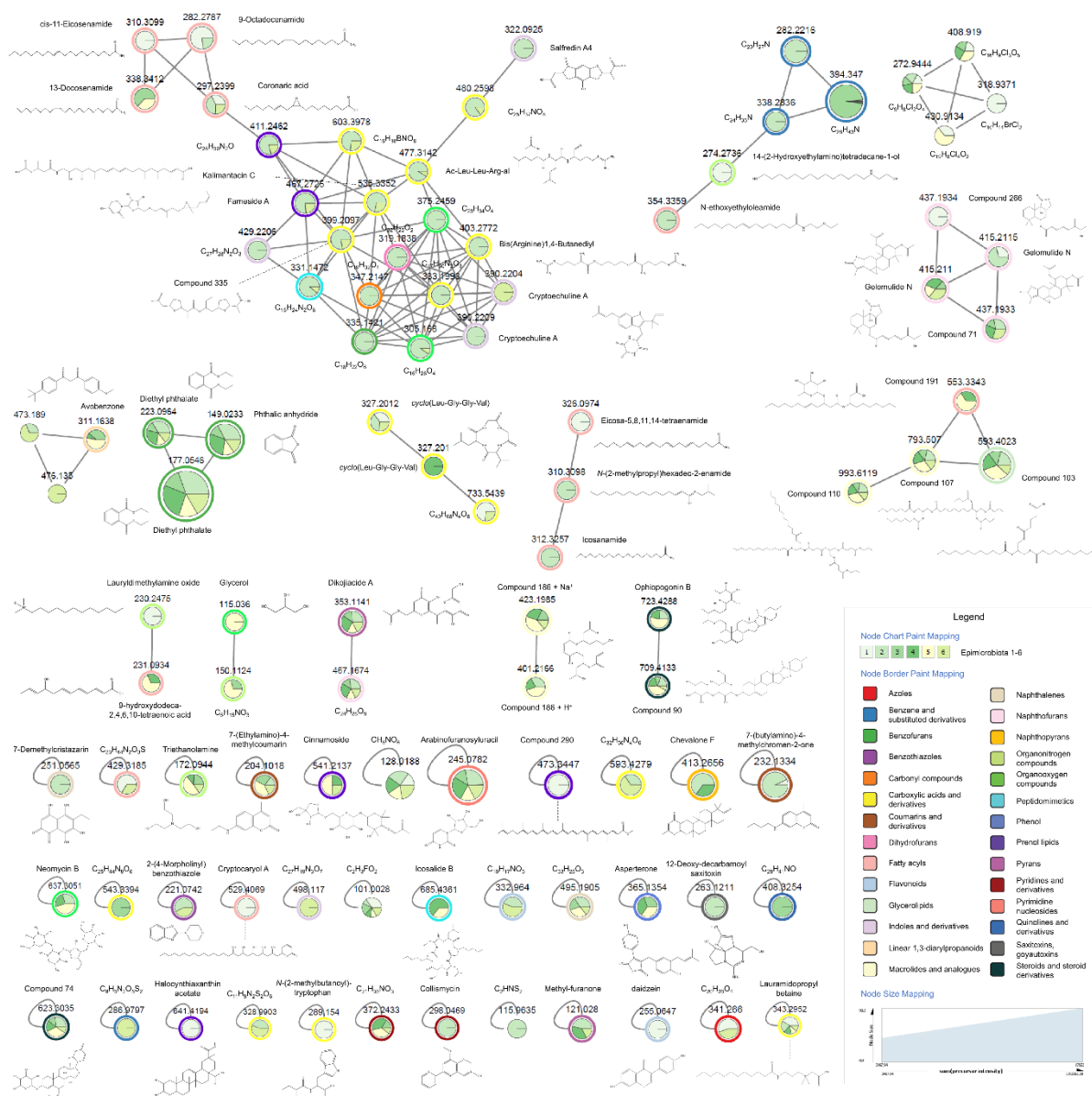
The fungal diversity of the *S. latissima* epimicrobiota was analyzed using ITS fragment sequencing. For the ITS dataset, one individual algal epimicrobiota sample (n = 6) was removed from the analyses because all the amplicons obtained were composed of chimeras and sequencing errors. Between 76 % and 98 % of the ASVs remained unassigned at the end of the analyses (**Supp. Figure II.2C**). The sequences not assigned by the UNITE 9 fungal database (9\_99\_27\_10\_2022) corresponded to the most abundant green algae in the family Ulvaceae (data not shown). Percentages of abundance were calculated by excluding these sequences. The diversity of assignable and identifiable fungal populations (**Figure II.1E and Figure II.1F, Supp. Table II.1C**) (37 ASVs) was much lower than that identified in the bacteria (683 ASVs) and eukaryotes (176 ASVs). At the phylum level, the seawater populations were composed of many species affiliated with Ascomycota (34–71 %, 14 ASVs) and Basidiomycota (29–62 %, 21 ASVs), whereas the fungal epimicrobiota were mostly affiliated with Basidiomycota (70–100 %), except for the epimicrobiota sample no. 5, which was only composed of Ascomycota. Epimicrobiota Sample no. 5 was composed of unassigned sequences. Once the unassigned sequences were eliminated, only one ASV remained, which corresponded to *Dendrostoma* sp. Of the Erythroglloeaceae family (**Figure II.1E and Figure II.1F**). Within the algal epimicrobiota populations (samples 1–4), the Malasseziaceae family was always present in variable proportion (1–12 %, 7 ASVs, 100 % for sample no. 3). Tylosporaceae (*Amphinema* sp.) were also present in the epimicrobiota samples no. 1, 2, and 4 (13–61 %, 1 ASV). The epimicrobiota of algae no. 2 was the most diverse in the presence of *Penicillium* sp. (13 %, 2 ASVs), *Debaryomyces* sp. (18 %, 1 ASV), *Sporobolomyces* sp. (38 %, 1 ASV), and *Sistotrema* sp. (14 %, 1 ASV) (**Supp. Figure II.2C**). However, the core metabolome has not been identified. All these families were also detected in the seawater samples but included other genera, such as *Exophiala* sp. (1 ASV), *Leptobacillum* sp. (1 ASV), *Phaeosphaeria* sp. (1 ASV), *Stereum* sp. (1 ASV), and *Valsaria* sp. (1 ASV).

The  $\alpha$ -diversity indices (Chao1, Shannon, and Simpson's) were calculated for the fungal epimicrobiota and seawater samples (**Supp. Figure II.3C**). The Chao1 index ranged from 1 to 6 (mean  $4.0\pm 2.0$ ) for the fungal epimicrobiota and from 5 to 17 (mean  $11.0\pm 4.6$ ) for the seawater communities. The Shannon index was  $0.85\pm 0.53$  for the algal epimicrobiota and  $1.82\pm 0.45$  for the seawater communities. The Simpson's index was  $0.443\pm 0.265$  for the fungal epimicrobiota and  $0.774\pm 0.079$  for the seawater communities. Statistical analyses revealed no significant differences between the seawater and fungal epimicrobiota communities ( $p$ -values= 0.055, 0.063, and 0.111 corresponding to Chao1, Shannon and Simpson index respectively, Mann-Whitney U test), presenting a statistically similar number of species.

### **Diversity of the metabolites expressed within *S. latissima* epimicrobiota**

The epimicrobiome of *S. latissima* was analyzed using LC-MS/MS. Following data processing, 299 metabolites were detected by MS and 98 by MS/MS (**Supp. Figure II.5, Supp. Table II.2 and Supp. Table II.3**). Analyses of the MS/MS data revealed seven superclasses, 28 classes, and 39 subclasses of compounds, leading to 60 putative annotations. Among the 97 metabolites, seven chemical superclasses were very different, including benzenoids, lipids, lipid-like molecules, acids and their derivatives, nucleosides and their analogs, nitrogen compounds, oxygen compounds, heterocyclic compounds, phenylpropanoids, and polyketides. The predominant classes were carboxylic acids and their derivatives (15 compounds), fatty acids (12 compounds), naphthofurans (six compounds), indoles and their derivatives (five compounds), prenol lipids (five compounds), macrolides (four compounds), and flavonoids (two compounds) as described in **Figure II.3**. Putative annotation was difficult because many compounds were not found in the database used. However, 46 compounds were annotated as natural products produced by bacteria, fungi, plants, and diatoms (**Supp. Table II.2**). Diethyl phthalate and phthalic anhydride were present and predominant in all the epimicrobiota. Numerous long-carbon fatty acids were annotated, including *cis*-11-eicosenamide, 13-docosenamide, 9-octadecenamide, arachidonamide, and *N*-ethoxyethyl(oleamide). Amino acid derivatives were also found, such as *cyclo*(Leu-Gly Gly Val) also called Leupeptin, and Kalimatacin C. Within the algal epimicrobiota, coumarins (two compounds), 7-ethylamino-4-methylcoumarin, 7-*N*-butyl-amino-4-methylcoumarin,

flavonoids (two compounds) including daidzein, and compound C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> were also detected.

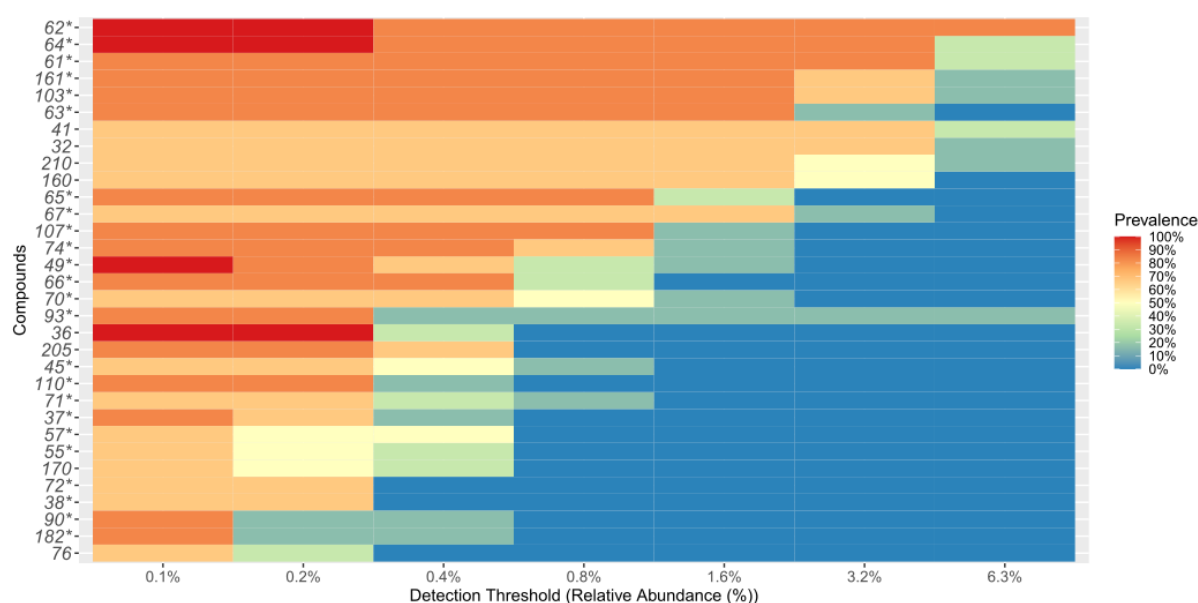


**Figure II.3:** Metabolites within *S. latissima* epimicrobiota. Featured-Based Molecular Networking obtained on GNPS with parameters Min Pairs Cos=0.7 and Minimum Matched Fragment Ions=4

The core metabolome, that is, the abundance and prevalence of metabolites detected by MS, was calculated, and visually represented as a heatmap (**Figure II.4**). The results demonstrated that the two most prevalent compounds were compounds 62 (diethyl phthalate) and 64 (arabinofuranosyluracil), which were present in 85 % of the samples with an abundance of 6.3 %. Compound 61, identified as phthalic anhydride based on the molecular peak  $[M+H-C_2H_6O]^+$ , was present in 85 % of the samples, with an abundance of 3.2 %. Phthalic anhydride was detected in 1.6 % of the samples (Compound 63). Compounds 161



(unannotated) and 103 (5-[2,3-di(dodecanoyloxy)propoxy]-5-oxopentanoic acid, triacylglycerol) were found in 85 % of the samples, accounting for 1.6 % of the total abundance. Compounds 41, 32, 210, and 160 were detected in 70 % of the samples with a minimum abundance of 1.6 %. However, these compounds remain unannotated as they were fragmented during MS/MS analysis. Compounds 65 (dikojiacid A) and 107 (2,3-di(octanoyloxy)propyl 9,10,11-tri(butanoyloxy)undecanoate, macrolide lactone) were present in 90 % of the samples but at a low abundance of 0.8 %. In the algal epimicrobiota, compounds 49 and 36 (unfragmented) were consistently present but at very low abundances of 0.1 % and 0.2 %, respectively.



**Figure II.4:** Abundance and prevalence of metabolites within *S. latissima* epimicrobiota. \*: compounds with a MS/MS spectra.

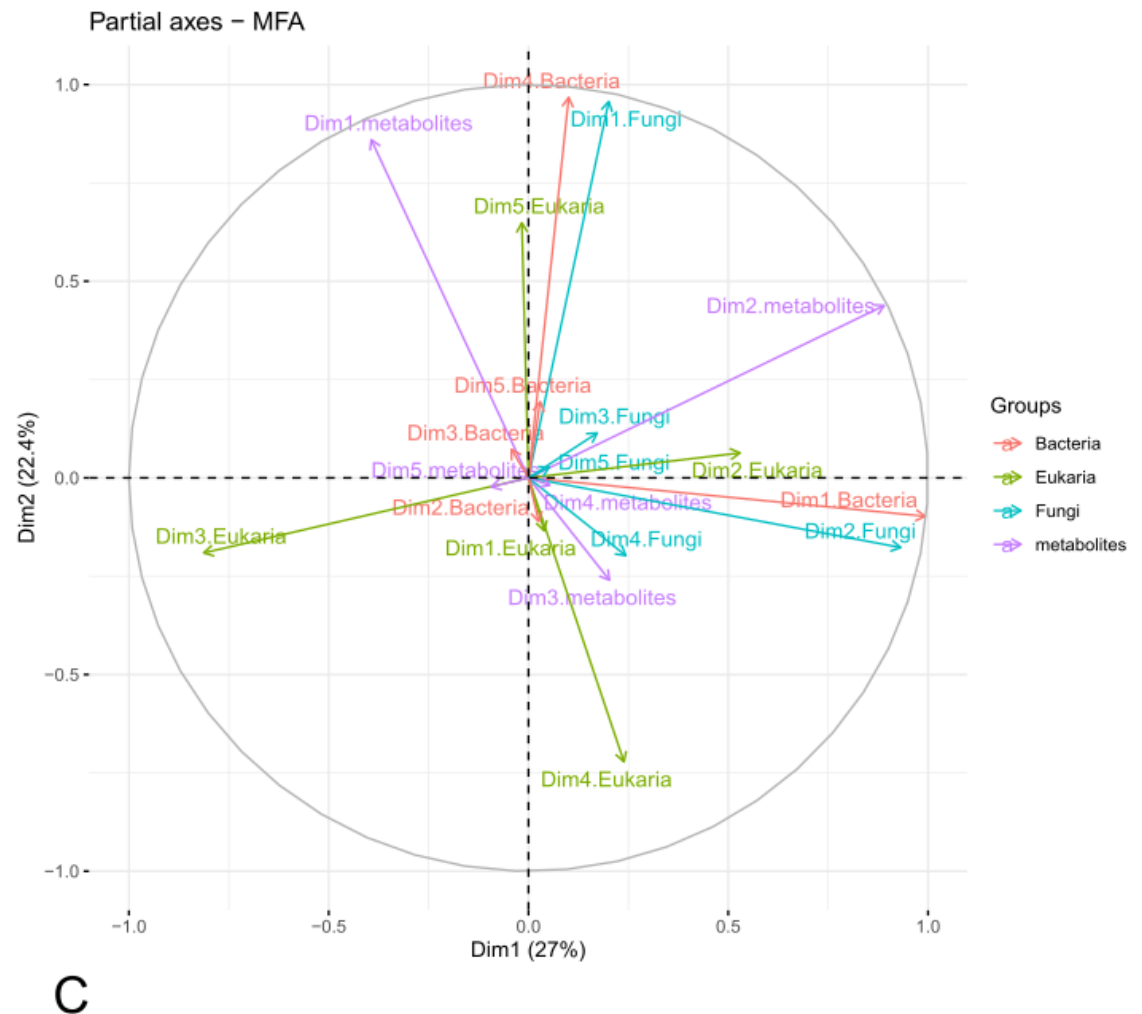
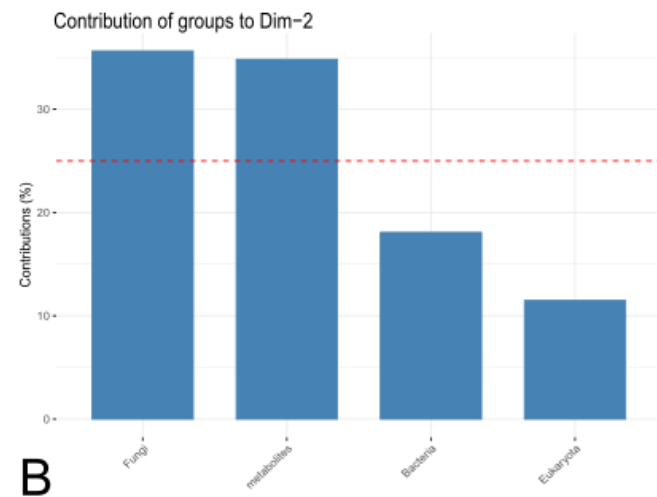
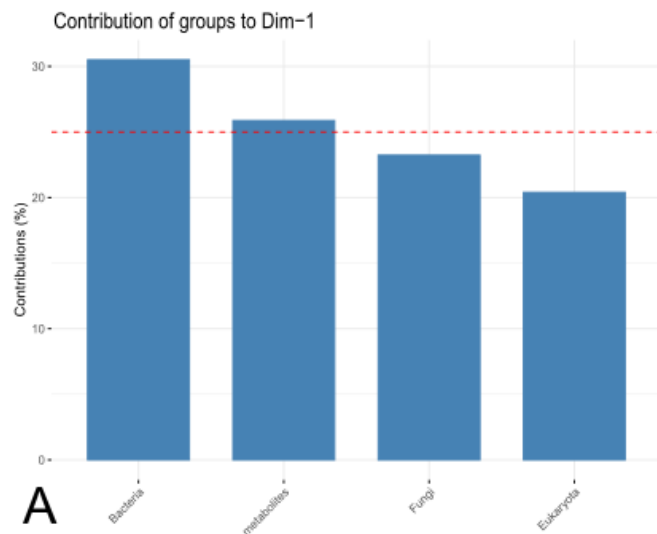
## Multi-omics approach assess to interindividual variation within *Saccharina latissima* epimicrobiota.

The association between the microbial communities (assigned ASVs of bacteria, eukaryotes, and fungi) and the total metabolites detected (MS data) was computed using a MFA. The graphical representation of the groups according to dimensions revealed that there was good agreement between the representation formed by the MFA and those formed by the bacteria, metabolites, eukaryotes, and fungi taken separately (**Supp. Figure II.6A and Supp. Figure II.6B**). All the groups (i.e., metabolites, eukaryotes, fungi, and bacteria) were relatively well represented by the first component of the MFA (bacteria: 30 % contribution, metabolites: 26 %, eukaryotes: 20 %, and fungi: 23 %) (**Figure II.5A and Figure II.6**). The

bacterial group exhibited the highest correlation with the first component of the MFA (**Figure II.5C,  $r = 0.95$** ). In contrast, the second principal component of the MFA clearly separated the fungi and metabolites from the bacteria and eukaryotes (**Supp. Figure II.6A**, fungi: 36 % contribution, metabolites: 26 %, bacteria: 18 %, and eukaryotes: 11 %) (**Figure II.5B and Figure II.5C**).

An in-depth analysis of the metabolites or contribution of microorganisms to each dimension further highlighted the importance of fungi and eukaryotes (**Supp. Figure II.6B**). Indeed, because the fungal sequences were poorly represented in the dataset, they were highly structured within dimensions one and two. However, the total contribution of fungi in dimension 1 was small compared to that of the bacteria. The fungal ASVs that contributed the most to dimension 1 (**Supp. Figure II.7A**) were *Debaryomyces* sp. (F7), *Puccinia* sp. (F10), *Amphinema* sp. (F33), and *Phlebia* sp. (F9), and for dimension 2 were *Sistotrema* sp. (F4), *Penicillium* sp. (F18), *Sporobolomyces* sp. (F19), *Debaryomyces* sp. (F9), and *Malassezia* sp. (F35) (**Supp. Figure II.7B**). *Debaryomyces* sp. exhibited a strong contribution to both dimensions. However, because many microorganisms and metabolites contributed to the dimensions, the significance threshold was not reached when the top 150 data points were displayed.

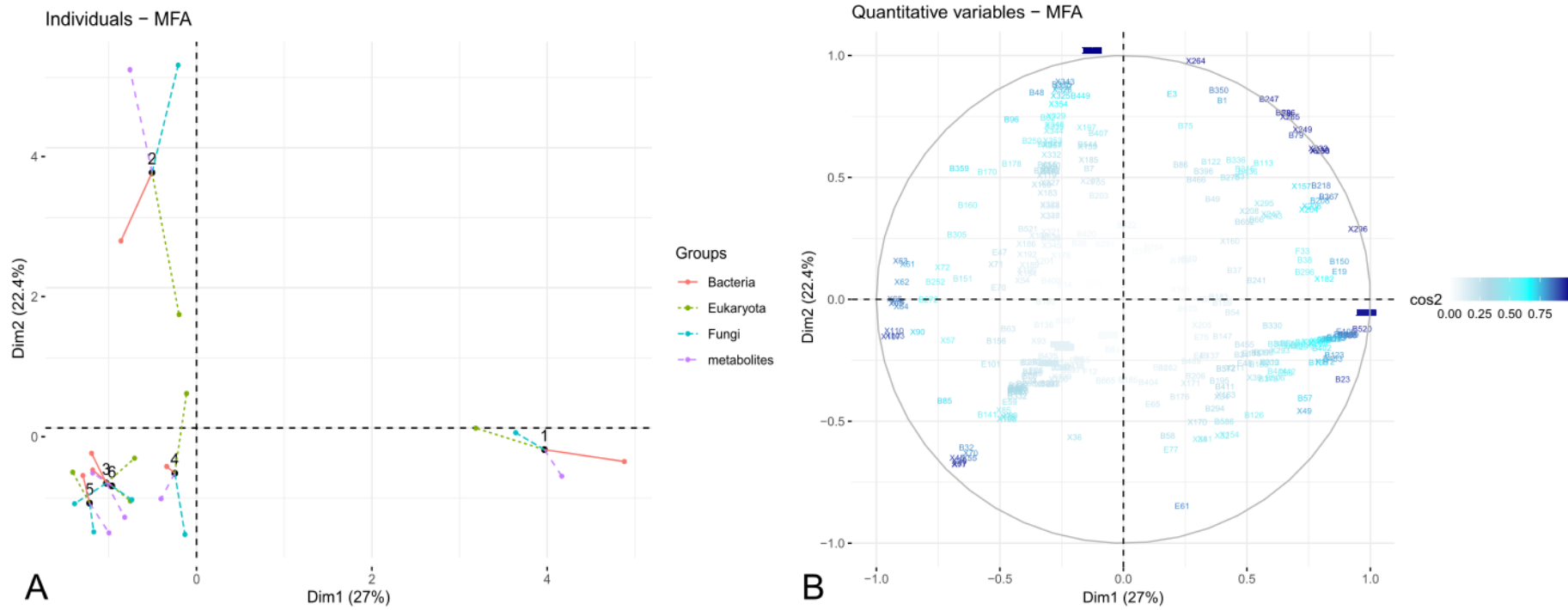
Variations in each group of variables for each individual epimicrobiota, that is, the epimicrobiota and their positions in relation to each other, were also studied (**Figure II.6A**). The axes of the partial individual factor map allowed us to observe how the individual would be placed if there was only one group of representations. The results for partial individuals showed that individuals 1 and 2 were particularly distinct from the others. Individual 1 mainly varied along dimension 1, which was well explained by all the groups, but mainly by bacteria, whereas individual 2 moved along dimension 2, which was mainly explained by a special combination of metabolites and fungal sequences (**Figure II.6A**). Furthermore, even if the factorial axes of the MFA appeared to be represented by one group, the different variables recorded were distributed homogeneously in the MFA plane (**Figure II.6B and Supp. Figure II.6B**).



**Figure II.5:** Multiple Factor Analysis (MFA) result: axis representation. **(A)** Contribution of each group to Dimension 1 **(B)** Contribution of each group to Dimension 2 **(C)** Partial axes plot colored by group

Focusing on the top variables (with coordinates > 0.8 on dimension 1), we extracted 97 bacterial ASVs, 12 eukaryotic ASVs, and two fungal ASV covariants with 44 metabolites (**Supp. Table II.4A**) corresponding to the variability of individual 1. Among these metabolites, 11 were putatively annotated, including fatty acids (arachidonamide and 9-octadecenamide), amino acids (*N*-(2-methylbutanoyl)tryptophan and lauramidopropyl betaine), isoflavones (daidzein), and triterpenoids (halocynthiaxanthin acetate). There was a wide range of bacterial ASVs, such as Proteobacteria (31), Firmicutes (24), Bacteroidota (19), Actinobacteriota (14), Acidobacteriota (1), Campilobacterota (1), Deinococcota (1), Desulfobacterota (2), Fusobacteriota (1), Myxococcota (1), Patescibacteria (1), and Verrucomicrobiota (1). The taxonomic diversity within this group of organisms was very high, with 59 bacterial families, 10 eukaryotic families, and two fungal families. The fungal ASVs were composed solely of Basidiomycota, *Phlebia* sp., and *Puccinia* sp. The eukaryotic ASVs were diverse, including Diatomea, Cnidaria, Porifera, Chlorophyta, Tunicata, and Basidiomycota (*Malassezia* sp.).

Focusing on the top variables with coordinates > 0.8 on dimension 2, associated with individual 2, we extracted 66 metabolites, as well as 36 bacterial ASVs, 3 eukaryotic ASVs, and 3 fungal ASVs (**Supp. Table II.4B**). The bacterial ASVs included Proteobacteria (16), Bacteroidetes (11), Desulfobacteria (4), Firmicutes (1), Fusobacteria (1), Nitrospirota (1), Planctomycetota (1), and Actinobacteria (1). The eukaryotic ASVs were Diatomea (2) and Arthropoda (1), while the fungal ASVs were Ascomycota (1), Basidiomycota (2), *Penicillium* sp., *Sporobolomyces* sp., and *Sistotrema* sp. These organisms covaried with 21 partially and putatively annotated metabolites, including fatty amides such as icosanamide, icos-11-enamide, *N*-ethoxyethyl(oleamide), amino acids ( bis(Arginine)1,4-butanediol and Ac-Leu-Leu-Arg-al), but also a saxitoxin (12-Deoxy-decarbamoylsaxitoxin), a coumarin (7-(*N*-Butyl)amino-4-methylcoumarin), a naphthoquinone (7-demethylcristazarin), a benzofuranone, and a furanone (butenolides).



**Figure II.6:** Multiple Factor Analysis (MFA) result: group of variables in each individual epimicrobiota (1-6) **(A)** Individuals plot factor map **(B)** Plot of quantitative variables colored by cos2.

## Discussion

### Diversity of the microbial communities colonizing the epimicrobiota of *Saccharina latissima* and their ecological roles

In our study, the microbial communities of *S. latissima* were identified using 16S rRNA gene sequencing to evaluate bacterial diversity, 18S rRNA gene sequencing to characterize whole eukaryotic diversity, and ITS fragment sequencing to target fungi more specifically. Our results showed that the bacterial and eukaryotic communities were specific to seawater and surface microbiota. In contrast, fungal communities (ITS sequence data) were less diverse on the algal surface than in seawater and did not follow similar patterns.

Concerning the bacterial communities, our results showed wide community diversity in the *S. latissima* epimicrobiota constituting mostly of Alphaproteobacteria (25–56 %), Gammaproteobacteria (25–59 %), and Bacteroida (7–16 %). These proportions are typical of the microbiomes associated with brown algae (Burgunter-Delamare et al., 2023; Hollants et al., 2013; Parrot et al., 2019; Stratil et al., 2014, 2013). However, we also detected a few Planctomycetes, unlike the observations made in *Laminaria hyperborea* (Bengtsson et al., 2010). Our results also showed strong interindividual variations in the epibacterial diversity among the 6 *S. latissimi* samples. This is consistent with the results of previous studies (Bengtsson et al., 2012; Lachnit et al., 2011; Stratil et al., 2013). Such fluctuations in epibacterial diversity can be explained by many factors such as temperature (Stratil et al., 2013), salinity (Stratil et al., 2014), and season (Bengtsson et al., 2010; Burgunter-Delamare et al., 2023; Paix et al., 2019), leading to large variabilities in the microbiota composition of green, red, and brown macroalgae (Lu et al., 2023). This fluctuation has also been observed in some algae (apex, meristem, stipe, blade, and spike) and their ages (Burgunter-Delamare et al., 2023; Staufenberg et al., 2008).

Despite the presence of large individual variations, we found a core bacterial epimicrobiota comprising Hyphomonadaceae, Granulosicoccaceae, Enterobacteriaceae, Rhodobacteraceae, and Flavobacteriaceae. These families have been identified as forming the core microbiota in previous studies. Notably, Granulosicoccaceae (6.3 %), including *Granulosicoccus* sp., has previously been observed in *Saccharina* sp. as belonging to the

microbiome (Balakirev et al., 2012; Burgunter-Delamare et al., 2023); Rhodobacteraceae (3.2 %) with *Sulfitobacter* sp. have also been identified in the *Fucus* sp. core microbiota (Stratil et al., 2014, 2013). The Hyphomonadaceae family has been depicted as part of the core microbiota of *Taonia atomaria* (Paix et al., 2019) and has been represented in our study by sequences affiliated with the genus *Hellea* sp. and *Litorimonas* sp.

The core bacterial microbiota plays a fundamental role in the physiology of *S. latissima*. The brown alga *Fucus* sp., Rhodobacteraceae-affiliated species, notably *Sulfitobacter* sp. and *Loktanella* sp., produce vitamin B12 and siderophores that favor algal growth (Dogs et al., 2017). Previous studies have reported that some of the bacterial genera identified in the present study, including *Winogradskyella* sp. (Dong et al., 2012) and *Granulosicoccus* sp. (Weigel et al., 2022) are involved in alginate degradation, which can contribute to growth and survival by helping regenerate tissue on the surface of alginate-rich brown algae, such as *S. latissima*. Algal epimicrobiota also play a role in regulating biofouling (Egan et al., 2008; Holmström et al., 2002). For example, *Pseudoalteromonas* sp. inhibits the colonization and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans* (Dobretsov and Qian, 2002). This genus is also widely recognized for its antifouling activity (Ballestriero et al., 2010; Bowman, 2007; Dahms and Dobretsov, 2017; Egan et al., 2008, 2002; Holmström et al., 2002).

Unlike epibacterial communities, the diversity of fungal communities within algal holobionts remains largely unexplored, and the taxonomic assignment of fungal species is often particularly difficult owing to a lack of fungal taxonomic data. However, recent studies have revealed that fungi establish symbiotic associations with marine macroalgae (Harvey and Goff, 2010; Loque et al., 2010; Vallet et al., 2018; Zuccaro et al., 2008, 2003). Access to the full diversity of the fungal epimicrobiota was challenging because 70–100 % of the fungal sequences remained unassigned. This is according to the results of the few studies conducted on marine fungi. (Chen et al., 2022; Yao et al., 2019). Nevertheless, our findings revealed low fungal diversity, characterized by 37 distinct ASVs, juxtaposed with strong interindividual variability. Several families identified in our samples were also found in the endophytic microbiota of *S. latissima*, including Cladosporiaceae, Malasseziaceae, and *Aspergillus* (*Penicillium* sp. in our study) (Tourneroché et al., 2020). Our study revealed the presence of Hypocreales and Pleosporales, which were also present in the epimicrobiota of *Fucus* sp. (Zuccaro et al., 2003). Among the Pleosporales, *Alternaria* sp. has been detected in *Undaria*

*pinnatifida*, *Colpomenia sinuosa*, and *Sargassum* sp. (Chen et al., 2022). Culture-dependent approaches have frequently been used for macroalgae, and the authors have managed to successfully isolate them. In this study, we detected *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Debaryomyces* sp., and *Stereum* sp. which have also been isolated from Culture-dependent approaches on various macroalgae (Abdel-Gawad et al., 2014; Fan et al., 2019; Godinho et al., 2013; Zuccaro et al., 2008, 2003). The functions of the fungal epimicrobiota remain poorly understood. However, it has been established that Basidiomycota likely contributes to the degradation of plant biopolymers, notably cellulose and lignin (Hyde et al., 1998; van der Wal et al., 2013). Other studies have shown that fungi such as *Mycophycias ascophylli* (order Dothideomycetes), an endophyte of *Ascophyllum nodosum*, protect algae from desiccation and produce bioactive compounds that combat pathogens (Fries, 1988, 1979; Garbary and London, 1995; Garbary and MacDonald, 1995). In *Fucus serratus*, in contrast, spores of *Acremonium fuci* (family Hypocreales) can only germinate in the presence of algal tissue (Zuccaro et al., 2004), supporting algal-fungal interactions. In addition, certain endophytic and epiphytic fungi, notably those of the orders Pleosporales and Hypocreales, associated with brown macroalgae, also produce antibiotic, antifungal, antioxidant, and larvicidal compounds (Fan et al., 2019; Flewelling et al., 2015; Sarasan et al., 2017).

Our investigation aimed to delineate the total eukaryotic community (18SrRNA dataset) within the epimicrobiota of *S. latissima*. The results showed that the colonization of *S. latissima* was more specific than that of seawater. This eukaryotic diversity, considered as biofouling, is already a subject of interest, notably in the farm cultures of *S. latissima* (Førde et al., 2016; Matsson et al., 2019; Peteiro and Freire, 2013; Rolin et al., 2017). We also showed that *S. latissima* is specifically colonized by numerous organisms (macro- and microorganisms). This diversity is mainly composed of Ectocarpales and Ochrophyta, corresponding to the macroalgal spores attached to the biofilm formed by the algal epimicrobiota, with *Ectocarpus* sp. and *Ulva* sp. frequently found in *S. latissima* cultures (Peteiro and Freire, 2013). Furthermore, the abundance of macroalgal spores is influenced by their multicellular nature, resulting in a greater presence of 18S rRNA genes. The presence of Diatomea (Mediphyceae, *Thalassiosira* sp.) in the biofilm is not surprising, as they are a food source for copepods or ciliates, notably Harpacticoida and Oligomenophorea also present in t (Peteiro and Freire, 2013).



Here, we showed that these organisms form the core eukaryotic epimicrobiota (18SrRNA dataset) in *S. latissima*. However, in the literature, these organisms are considered as biofouling and not just as the "core microbiota." Nevertheless, in conjunction with the surrounding seawater, the juxtaposition of their limited abundance and the relatively small number of ASVs attributed to micro- and macro-foulants is quite complex. *S. latissima* appears to be colonized by only a handful of organisms, and these observations highlight the ability of the *S. latissima* holobiont to control biofouling. Brown macroalgae have been particularly studied for their ability to produce antibacterial compounds, including anti-quorum sensing (QS), anti-algae, anti-diatoms, and anti-larvae, as reviewed by (Chapman et al., 2014; Dahms and Dobretsov, 2017; Saha and Wahl, 2013), but this ability has not been demonstrated for the *S. latissima* holobiont.

### **Surface metabolome of *S. latissima***

We determined the surface metabolome of *S. latissima* using a non-targeted metabolomic approach. The annotation of metabolomes from marine holobionts is still challenging because of the lack of common databases (Paix et al., 2019), and because only a few marine holobionts have been previously explored using metabolomics (corals, sponges, and some macroalgae). However, putatively annotated metabolites can provide valuable information on possible interactions between different partners of the holobiont (Paix et al., 2019; Parrot et al., 2019).

Within the *S. latissima* surface metabolome, our metabolomic analyses revealed 97 metabolites, 7 superclasses, 28 classes, and 39 subclasses of compounds, with 95 molecular formulas and 60 putative annotations. The most common compounds were fatty acids (12 compounds) including *cis*-11-eicosenamide, 13-docosenamide, and 9-octadecenamide. The role of fatty acids remains unclear; however, their diversity is important in macroalgal holobionts (Paix et al., 2020, 2019). They are used as biosurfactants and have been detected in various species, such as bacteria (*Bacillus* sp.), fungi, algae, plants, and sponges (Donio et al., 2013; Jamal and Satheesh, 2022; Kendel et al., 2013). Hexacanamide and erucamide have been identified in several large clusters (Reddy et al., 2023). Other studies have shown that amine fatty acids are present in healthy coral microbiota and decrease during diseases (Chen

et al., 2017; Pei et al., 2022). Certain fatty acids have been shown to inhibit pathogen virulence (Nobori et al., 2018; Xiao et al., 2004).

Compounds that are also widely diverse are small peptides (14) such as *N*-(2-methylbutanoyl)-tryptophan and Kalimantacin C. Low-molecular-weight peptides isolated from bacteria and fungi display general biological activities, such as antibacterial and antifungal activities (Sánchez and Vázquez, 2017). Some peptides are known to inhibit QS, a communication mechanism based on cell density (Gowrishankar et al., 2019; Li et al., 2023; Wang et al., 2022b; Yu et al., 2021). Kalimantacin C, isolated from *Alcaligenes* sp., has strong antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* (Kamigiri et al., 1996). In addition, we detected two naphthoquinones that could be involved in interactions between microorganisms. Quinones affect various cellular signaling pathways that promote and protect against inflammatory responses and cellular damage (Kumagai et al., 2012).

In this study, we highlight the core metabolome of the *Saccharina latissima* epimicrobiota, composed of putatively annotated diethyl phthalate, dikojic acid A, compound 103 (5-[2,3-di(dodecanoyloxy)propoxy]-5-oxopentanoic acid, triacylglycerol), compound 107 (2,3-di(octanoyloxy)propyl 9,10,11-tri(butanoyloxy)undecanoate, macrolide lactone), and arabinofuranosyluracil. However, the attribution of compounds to a particular organism remains difficult because of a lack of information in the databases and the huge diversity of organisms present on the surface of *S. latissima*. The presence of diethyl phthalate is rather common, and it is generally produced by bacteria and fungi, such as *Streptomyces* sp., *Brevibacterium* sp., and *Penicillium* sp. (Huang et al., 2021; H. Zhang et al., 2018). This compound displays antimicrobial and cytotoxic activities and is involved in many types of interactions between microorganisms (Al-Bari et al., 2005; Huang et al., 2021). Compound 103 is a member of the triacylglycerol family; however, its role remains to be explored. Nevertheless, the presence of triacylglycerols (TAGs) is not surprising given that macroalgae are a source of biofuels. Compound 107 is a macrolide lactone whose role is unknown; however, several studies have shown that macroalgal macrolide lactones are effective antibiotics. These compounds are produced by both bacteria and fungi (Carroll et al., 2022; Chakraborty et al., 2021, 2020; Kizhakkepatt Kizhakkekalam et al., 2020). Dikojic acid A is a natural kojic acid dimer isolated from the plant endophyte *Aspergillus flavus* (Xu et al., 2018). Kojic acid is a Cu-chelating compound with anti-inflammatory and antioxidant properties

(Cabanes et al., 1994; Choi et al., 2012). Arabinofuranosyluracil, also known as spongouridine, has been isolated from the holobiont of the marine sponge *Tectitethya crypta* and yellow gorgonian *Eunicella cavolini* (Bergmann and Burke, 1956; Cimino et al., 1984). Its production by *Vibrio harveyi* has also been demonstrated (Bertin et al., 2015). However, other epiphytic organisms such as *S. latissima* may be capable of producing it.

Among the compounds of the epimetabolome, we detected daidzein and an unknown flavonoid compound (phytoestrogen), as well as two coumarins, 7-ethylamino-4-methylcoumarin and 7-*N*-butyl-amino-4-methylcoumarin, which are potentially involved in cross-kingdom interactions. Coumarins are frequently involved in cell signaling, especially QS and biofilm formation, as activators or inhibitors (“Coumarin,” 2018; Gutiérrez-Barranquero et al., 2015; Lee et al., 2014). Antibacterial, antiviral, and antifungal coumarins produced by bacteria, fungi, and algae have been reported in previous studies (Dixit et al., 2020). We also identified two furanones: an unknown butenolide with the molecular formula  $C_{22}H_{22}O_2$  and a methyl-furanone. Furanones are strong QS inhibitors (Kuehl et al., 2009; Manefield et al., 2002; Phainuphong et al., 2017; Vallet et al., 2020). The red macroalga, *Delisea pulchra*, regulates fouling and colonization by pathogens (De Nys et al., 1995; Harder et al., 2012; Rasmussen et al., 2000). Since then, numerous furanones and butenolides produced by bacteria and fungi have shown promise as antifouling compounds (Paulitz et al., 2000; Phainuphong et al., 2017; Vallet et al., 2020). Overall, our study indicates that the *S. latissima* surface metabolome includes numerous metabolites that are potentially involved in the chemical interactions between organisms.

## **Interindividual correlation of the microbial diversity and surface metabolome.**

To draw links between the variations in the phyla and compounds, we correlated microbial diversity and metabolomic patterns. We previously highlighted the existence of a bacterial microbiota core composed of abundant ASVs and a metabolome core within the epimicrobiota of *S. latissima*. The results were consistent with that of a previous study on the epiphytic bacteria of the brown alga *Taonia atomaria* (Paix et al., 2021a, 2019). However, significant variations were observed in the microbial communities and associated metabolites of the two algal samples (**Figure II.5**). In all the other individuals, the microbial communities

and associated metabolomes were relatively similar. Unfortunately, we currently lack an explanation for these unique variations observed exclusively in two individuals. However, they give us the opportunity to study co-variations between microbial communities and associated metabolites.

The covariation group associated with the epimicrobiota of individual no. 1 comprised bacteria (97 ASVs), eukaryotes (12 ASVs), fungi (2 ASVs), and 44 metabolites (11 putatively annotated). This individual varied along dimension one, indicating that the bacteria and metabolites differed significantly. The taxonomic diversity within this group of organisms was very high, with 59 bacterial, 10 eukaryotic, and 2 fungal families. These bacteria included Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria. Among the eukaryotes (eukaryotic 18S rRNA-based and ITS fragment-based datasets), we found the Cercozoa, Chlorophyta, Ciliophora, Cnidaria, Diatomea, Phragmoplastophyta, Porifera, Tunicata, and Basidiomycota phyla. The metabolites putatively annotated to form this group were fatty acids (arachidonamide and 9-octadecenamide), amino acids (N-(2-methylbutanoyl)-tryptophan and lauramidopropyl betaine), isoflavones (daidzein), and triterpenoids (halocynthiaxanthin acetate). Moreover, fatty acid amides have been shown to have a high toxic potential for fish and grazing organisms (Bertin et al., 2015). Fucoxanthin and carotenoids, including halocynthiaxanthin acetate, are among the metabolites involved in the chemical defense of algae (Saha et al., 2011).

The second covariation group, associated with the epimicrobiota of individual no. 2, comprised bacteria (36), eukaryotes (3), and fungi (3), linked to 66 metabolites (21 putatively annotated). The epimicrobiota of sample no. 2 was particularly interesting because it highlighted a strong covariation between the fungal communities (ITS fragment dataset) and metabolomic data, indicating that fungi may drive the production of the main chemical compounds in the epimicrobiome of this individual. This individual exhibited the highest abundance of fungi. Such observations are not surprising, as marine fungi are important producers of secondary metabolites (Deshmukh et al., 2018; Gonçalves et al., 2022; Hasan et al., 2015; Imhoff, 2016). However, their diversity and roles in algal epimicrobiota remain unclear and poorly studied (Chen et al., 2022; Yao et al., 2019). This observation suggests that fungi produce specific and different metabolites depending on the algae sampled, whereas core bacteria may produce identical compounds among the different epimicrobiota. This

consortium group included 20 bacterial families, as well as two eukaryotic and three fungal families. The most abundant bacterial phyla were the Bacteroidetes and Proteobacteria. The eukaryotic families (18S-based dataset) included Harpacticoida and Fragilariales and the fungi families (ITS-based dataset) included Aspergillaceae, Sporidiobolaceae, and Hydnaceae. The metabolites involved in this group were fatty amides such as icosanamide, icos-11-Enamide, N-Ethoxyethylamide, amino acids (Bis(Arginine)1,4-butanediol and Ac-Leu-Leu-Arg-al), but also a saxitoxin (12-Deoxy-decarbamoysaxitoxin), a coumarin (7-(N-Butyl)amino-4-methylcoumarin), a naphthoquinone (7-Demethylcristazarin), a benzofuranone and a furanone (butenolides). Within this group of covariations, defensive metabolites were also involved, including fatty acid amides (Bertin et al., 2012) and anti-QS compounds, such as furanones and their derivatives (de Nys et al., 1993; Harder et al., 2012).

The algal holobiont of *S. latissima*, like many macroalgae, is a site of intense, multidirectional communication between microorganisms (Egan et al., 2013; Tourneroc et al., 2020, 2019; Wahl et al., 2012), and our results support this view. We identified several compounds involved in the interactions between organisms, such as antibiotics (neomycin B) and phytoestrogens, and compounds involved in QS, such as coumarins. These metabolites can be produced by many organisms in response to environmental stressors or pathogen development and were not detected in individuals 1 and 2. A striking result was the covariation of furanone (butenolides, C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>) and benzofuranone (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>) with several organisms, including bacteria, fungi (*Penicillium* sp., *Sporobolomyces* sp., *Sistotrema* sp.), and eukaryotes of the Fragilariales and Harpacticoida families. In general, QS inhibitors are produced by bacteria, fungi, and algae to regulate microbial fouling by inhibiting biofilm formation or attachment (Dobretsov et al., 2011b; Li et al., 2018; Stewart et al., 2014; Vallet et al., 2020; Yin et al., 2019). Thus, fungal and bacterial communities may play a role in the defense of the algae against biofoulers and pathogens in *S. latissima*.

Overall, our analysis suggests that bacterial and fungal consortia drive the expression of a specific set of metabolites. This result is in line with previous studies on the scale of bacterial communities in algal holobionts (Bonthond et al., 2020; Burke et al., 2011b, 2011a; Florez et al., 2017). It is also important to note that our study did not highlight the metabolic response of *S. latissima* to changes in its microbiota, which could induce the production of other compounds in response to changes in its microbial communities. Our approach enabled

us to establish a link between the structure and function of microbial communities and identify two microbial consortia involved in the possible chemical defense of macroalgae.

## **Acknowledgements**

We acknowledge the Roscoff Biological Station for hosting our field missions. We would like to greatly thank to Arul Marie and Remy Puppo for acquiring MS/MS spectra on the Mass Spectrometry technical platform. We are grateful to the Bio2Mar platform (<http://bio2mar.obs-banyuls.fr>) for its technical assistance and support. We are grateful to LGC Genomics GmbH, the company that performed the metabarcoding sequencing (<https://www.lgcgroup.com/>). Phd fellowship to AE was funded by the Institute of Environmental Transition of Sorbonne University (SU-ITE) and experiment by SU-ITE and the Thematic Action of the National Museum of Natural History (ATM).

## **Author contributions**

EA performed the experiments. EA, CH, SP and RL performed the analysis. EA, CL, SP, and RL design the project. EA, CH, RL, and SP wrote the manuscript. All authors had full access to all the data in the study and accept responsibility for the decision to submit for publication.

## **Declaration of interests**

The authors declare no competing interests.



# Chapitre III. Importance du quorum sensing dans la régulation de l'épimicrobiote de *S. latissima*







## Avant-propos

Pour aller plus loin dans la compréhension des interactions au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*, nous avons évalué l'impact d'une modification des signaux de communication de quorum sensing (QS) dans la régulation de la composition taxonomique et des métabolomes de surface de *Saccharina latissima*. Nous avons suivi les modifications des communautés microbiennes et des composés associés au cours du temps en présence d'activateurs et d'inhibiteurs des mécanismes du QS.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article de recherche en cours de rédaction. Les données relatives à la diversité microbienne et aux métabolomes sont en cours d'analyses approfondies. Une corrélation entre les données de diversité microbienne et de métabolomique sera également effectuée par le package R, *MixOmics*, à l'image de celles conduites dans le chapitre II. Les références bibliographiques citées dans cet article sont indexées à la fin du manuscrit. Les figures supplémentaires se trouvent dans les **Annexes du Chapitre III** et dans les **Annexes Électronique du Chapitre III**.



# Article: Effect of QS compounds on microbial communities within *Saccharina latissima* epimicrobiota (Laminariales, Phaeophyceae)

Emilie Adouane<sup>1,2</sup>, Sylvie Rousvoal<sup>3</sup>, Cédric Hubas<sup>4</sup>, Catherine Leblanc<sup>3</sup>, Raphaël Lami<sup>2\*\*</sup> and Soizic Prado<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Muséum National d'Histoire Naturelle, Unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-Organismes MCAM, UMR 7245, CNRS, Sorbonne Université, 75005 Paris, France*

<sup>2</sup> *Sorbonne Université, CNRS, UAR 3579 Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes LBBM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France*

<sup>3</sup>*Biologie Intégrative des Modèles Marins, LBI2M (Sorbonne Université/CNRS), Station Biologique de Roscoff (SBR), 29680 Roscoff, France.*

<sup>4</sup>*Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire Biologie des Organismes et Écosystème Aquatiques (UMR 8067 BOREA), Sorbonne Université, CNRS, IRD, Université de Caen Normandie, Université des Antilles, Station Marine de Concarneau, Quai de la croix, 29900 Concarneau, France*

\*co-last authors

<sup>+</sup> : corresponding authors: [soizic.prado@mnhn.fr](mailto:soizic.prado@mnhn.fr) and [raphael.lami@obs-banyuls.fr](mailto:raphael.lami@obs-banyuls.fr)

## Subject areas

Brown macroalgae, holobiont, epiphytic communities, quorum sensing, metabarcoding, metabolomics

## Introduction

Brown macroalgae, particularly the Laminariales, play a crucial role in temperate coastal ecosystems and are strong primary producers. *Saccharina latissima* stands out as one of the primary brown macroalgae species in Europe. These macroalgae serve as nutrient sources for numerous organisms and have a substantial impact on biodiversity (D. Schiel and Lilley, 2007; Schiel and Foster, 2006). Like many eukaryotes, brown macroalgae are colonized by a multitude of microorganisms, forming with their host a "superorganism" called holobiont (Egan et al., 2013; Wahl et al., 2012). The algal epimicrobiota resembles a biofilm, known as a "second skin" (Wahl et al., 2012), is the site of specific chemical and ecological interactions (Egan et al., 2013; Wahl et al., 2010). The interactions between the colonizing microorganisms are finely regulated by the production of chemical substances that can impact both the host and epimicrobiota physiology (Coelho-Souza et al., 2017; Dittami et al., 2016; Goecke et al., 2010). These microorganisms in the algal holobiont have strong, multidirectional interactions that rely on the production of chemical signals (Egan et al., 2013; Goecke et al., 2010; Harder et al., 2012). Macroalgae are also capable of chemically gardening protective microorganisms for enhanced protection against disease (Saha and Weinberger, 2019). However, our understanding of surface-mediated signaling processes and the nature of chemical mediators is still very limited. Overall, our understanding of the diversity of colonizing microbes and their ecological roles, as well as how they interact with each other and their host, remains incomplete.

Quorum sensing (QS), a microbial communication mechanism based on cell density, plays a key role in biofilm formation (Fuqua et al., 1994; Nealson, 1977; Schulz, 2014) modulates the expression of various genes, including, among others those related to virulence factors, sporulation, or bacterial conjugation (Abisado et al., 2018; Atkinson and Williams, 2009; Bassler, 1999). Although the role of QS in algal holobionts has received limited attention, studies have underscored that bacterial strains in symbiosis with some hosts emit QS autoinducers, and more specifically *N*-acyl-homoserine lactone (AHLs) and type 2 autoinducer (AI-2), emphasizing the importance of considering QS relationships within the algal microbiota (Rolland et al., 2016). In macroalgae, it has notably been shown that zoospores of the genus *Ulva* sp. (a green macroalga) are slowed by the QS compounds produced by bacterial biofilms

favoring their settlement (Joint et al., 2007; Tait et al., 2005; Wheeler et al., 2006). We also revealed in previous work from our lab that endophytic microorganisms isolated from the brown alga *Saccharina latissima* were able to communicate using QS compounds, notably AI-2. Collectively, all these data highlight the importance of QS compounds as key metabolites in the complex network of interactions within the algal holobiont (Tourneroché et al., 2019).

Additionally, research to reveal the roles of QS within marine holobionts has revealed its widespread nature, as many communities associated with these organisms, including pathogens, have the ability to produce autoinducers (Meyer et al., 2016; Rosenberg et al., 2007; Zimmer et al., 2014). Alterations in these chemical signals have been implicated in polymicrobial diseases and dysbiosis (KleinJan et al., 2023; Tait et al., 2010). To defend themselves against pathogens and regulate the colonization of surfaces by micro-organisms, some organisms have adopted anti-QS strategies. The best-known example is the red macroalga *Delisea pulchra* producing halogenated furanones (De Nys et al., 1995; de Nys et al., 1993). These compounds were shown to inhibit QS circuits, enable the alga to defend itself against pathogens and grazers, also regulating (“gardening”) its surface microbiota (Manefield et al., 1999; Rasmussen et al., 2000; Wright et al., 2004, 2000). Many macroalgae have been shown to produce QS-inhibiting compounds, such as the red macroalga *Asparagopsis taxiformis* (Jha et al., 2013), the brown macroalgae *Padina gymnospora* (Sethupathy et al., 2016) and *Sargassum sp.* (Schwartz et al., 2017), the green macroalga *Ulva sp.* (Batista et al., 2014) and many others (Carvalho et al., 2017; Dahms and Dobretsov, 2017). Nevertheless, the mechanisms involved in the production of such compounds, particularly in brown macroalgae, remain relatively unexplored. QS compounds (either activating or inhibiting QS circuits) can originate not only from the alga itself but also from its microbiota, rendering surface interactions even more intricate and dynamic, though these processes have yet to be fully deciphered.

The aim of this study was to determine how QS affects the regulation of the microbiota on the surface of the model brown algae *Saccharina latissima*. To this end, we added two synthetic QS compounds - an activator, C10-HSL, and an inhibitor, furanone C30 - to laboratory-cultivated *Saccharina latissima* sporophytes. We monitored the change in microbial communities (bacterial, fungal, and other eukaryotes) and surface metabolomes over time. Our study aimed to understand and quantify the impact of these QS compounds

on microbial communities (based on a metabarcoding approach) and on the emission of chemical compounds (based on a metabolomics approach). Such methodology allowed us to gain a deeper insight into the composition of epiphytic communities on *Saccharina latissima*, on how the microbiota diversity and functions are impacted by particular QS signaling compounds, involved in cell-cell interactions.

## Materials and methods

### Selection of QS compounds concentrations

To determine the minimum concentration of QS compounds to be used in this algal epimicrobiota modification experiment, a calibration experiment was first carried out. Three young seedlings were selected and placed in pillboxes (17) containing sterile seawater. QS compounds (C10-HSL and furanone-C30) were added at different concentrations: 0.1; 1; 10 ; 25 and 50  $\mu\text{M}$  diluted in EtOH (100%). Two controls were performed (i) addition of seawater (ii) addition of EtOH. Pills were incubated at 13°C with a 12/12 light cycle for 72 h. Maximum photosystem II yield (Fv/Fm) was then measured at T0h, T24h, T48h and T72h using a JuniorPAM (Walz, Effeltrich, Germany). Seedlings were darkened for 10 minutes prior to measurement. Data were processed on GraphPad Prism 9.5.1. using a Kruskal-Wallis's test.

### *In vitro* modification of algal epimicrobiota by QS compounds

Prior to experimentation, 3 sporophytes (in quintuplicate) were taken from the seedling culture. The seedlings were then separated, distributed in 9 \* 2L bottles (approx. 18 sporophytes/bottle) containing sterile seawater (750 ml), and acclimatized for 72h, at 13°C, in a 12:12 cycle. In each bottle and in quintuplicate, at T0h, a compound involved in QS (C10-HSL) or an inhibitor of QS mechanisms (halogenated furanone C30) at a concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  (in EtOH) was added. Controls (also in quintuplicate) consisted respectively of sterile seawater and EtOH (10 $\mu\text{L}$ ). The bottles were incubated again under the same conditions as before. At T0h, T24h, T48h, T72h and T7day, 3 sporophytes from each bottle were taken and immediately sampled (see below). A glass filter control in sterile seawater was also carried out.

## Sampling of algal epimicrobiota

Sporophytes were collected (3 per bottle, 5 bottles by conditions) and disposed in Petri dishes (35mm) after a quick draining. The three algae were scraped with a glass fiber filter (GF/F, 37 mm diameter), previously calcined (400°C). The glass fiber filter was split into two and then transferred to a hemolysis tube, one containing 1 ml of MeOH (metabolites samples) and one containing 1 ml of distilled water (DNA samples). The glass filter control was separated in the same way. All samples were then vortexed and transferred to -20°C waiting for metabolites and DNA extractions.

## Extraction of total DNA from algal epimicrobiota

The DNA samples (glass fiber filters) were vortexed and transferred into the Lysing Matrix E tube of the FastDNA™ SPIN kit for Soil (M.P. Biomedicals). The DNA extraction was performed following the recommendations of the kit without any modification. Then, the extracted DNA was quantified with a Quantus fluorometer (Promega) and the quality was checked with a DeNovix® DS-11 FX+ Spectrophotometer/Fluorometer.

## Nanopore MinION-based high-throughput sequencing

Rosella Biosystem facilities (Clapiers, France) performed the high-throughput sequencing following their routine protocols. Briefly, 16S rRNA, 18S rRNA genes, and ITS genomic fragments were separately amplified by PCR using respective primers 341F/1391R (Beckers et al., 2016; Thomas et al., 2020), 391F/1626R (Hugerth et al., 2014), ITS-u1/ITS-u4 (Cheng et al., 2016). The used primer pairs are described in **Supp. Table III.1**.

The ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard (ZymoResearch, USA) was used as positive control. A 30-cycles PCR was conducted using the UCP Multiplex PCR Kit (Qiagen, USA) under the following conditions: 95°C for 15 min, followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 3 min, after which a final elongation step at 72 °C for 10 min was performed. After amplification, library preparation and indexing were performed with the Native Barcoding 24 kit V14 (Oxford Nanopore Technologies, UK). Sequencing was finally performed on a MinION following the manufacturer's guidelines and using MinION flow cells (R10.4.1) (Oxford Nanopore Technologies, UK). Rosella biosystem also performed raw data processing. Information on these steps, such as denoising and assignment, can be found in **Supp. Materials and Methods**.



The OTUs tables were then exported and the results were processed using Rstudio (4.2.3, 2023-03-15) (R Core Team, 2023) with the library *phyloseq* (v.1.40.0) , *ggplot2* (v.3.4.0), *vegan* (v.2.6.4), *dplyr* (v.1.0.10), *scales* (v.1.2.1) , *reshape2* (v.1.4.4) (McMurdie and Holmes, 2015, 2013) on the following GitHub available workflow <https://joey711.github.io/phyloseq/>.  $\alpha$ -diversity indexes (Chao 1, Simpson, and Shannon diversity index) were calculated, bar plots and statistical analyses (Kruskal-Wallis's and Dunn's tests) were performed using GraphPad Prism 9.5.1.

## **Extraction of metabolites and LC-MS-based Metabolomic Analysis**

Metabolites samples were vortexed then centrifuged (10000 rpm, 15 min) and the supernatant was recovered and filtered (fiber paper). To recover the maximum of compounds, the glass filter was rinsed 4 times with MeOH while recovering and filtering each time the supernatant (fiber paper). The samples were then dried and resuspended with MeOH before centrifugation to remove all traces of fiberglass before being dried again. To remove the salt, the sample was diluted in ethyl acetate, then in distilled water and a liquid-liquid extraction was performed. The ethyl acetate organic phase was collected and evaporated.

Samples were then solubilized in 40  $\mu$ L of methanol and analyzed by HPLC-MS/MS in one batch and a random batch (5 samples followed by 3 QCs in alternating order) following the laboratory protocols already established (Tourneroché et al., 2020; Vallet et al., 2018). The separation occurred onto the C18 Acclaim™ RSLC PolarAdvantage II column (2.1  $\times$  100 mm, 2.2  $\mu$ m of pore size; Thermo Fisher Scientific, United States) connected to a Dionex Ultimate 3000 HPLC system and coupled to a Maxis IITM QTOF mass spectrometer (Bruker, United States) with an electrospray ionization source. The MS parameters were 3.5 kV of electrospray voltage, 35 psi of nebulizing gas (N<sub>2</sub>) pressure, drying gas (N<sub>2</sub>) flow rate of 8 L.min<sup>-1</sup>, and 200°C of drying temperature. The mobile phases were water (0.1 % formic acid) and acetonitrile (0.1 % formic acid, solvent B) following a gradient of B at 5, 50, 90, and 5% for 0, 9, 15, and 21 min, respectively.

LC-MS/MS data were analyzed using DataAnalysis (version 4.4 Bruker Daltonik GmbH) and converted to “.mzXML”. The LC-MS/MS data were preprocessed on MzMine 3.2.8 (Pluskal et al., 2010; Schmid et al., 2023) with a noise level of 1E3 for MS1 and 2E1 for MS2, the ADAP chromatogram built with a minimum group size of scan of 2, a group intensity threshold and

minimum highest intensity at 1E3 (Myers et al., 2017). The chromatograms were resolved with ADAP Module Disclaimer with S/N threshold at 10, minimum feature height at 1, coefficient/area threshold at 10, 0.02-1.00 for peak duration range and 0.10-0.50 for RT wavelet range. The data were then deisotoped and filtered to only keep peaks with MS2 scans and a RANSAC alignment has been performed. After alignment, the white was subtracted from the matrix. This step eliminates any compounds that may have come from external contamination during experimentation. The data were then exported on FBMN-GNPS to build a molecular network with a cosine of 0.6 and 4 minimum matched fragment ions, precursor ion mass tolerance (PIMT) and fragment ion mass tolerance (FIMT) at 0.05 Da (Nothias et al., 2020; M. Wang et al., 2016). Metabolites were annotated with various GNPS tools, including Library Search, Dereplicator, Dereplicator + (Mohimani et al., 2018), as well as Sirius 5.6.3 (Dührkop et al., 2019) using the tools Molecular formula identification, ZODIAC, CSI:FingerID, CANOPUS (Djoumbou Feunang et al., 2016; Dührkop et al., 2021, 2015; Hoffmann et al., 2021; Kim et al., 2021; Ludwig et al., 2020). Furthermore, the *m/z* values and mass formulas were searched and annotated using the natural products databases NPAtlas, MarinLit, and LOTUS (Rutz et al., 2022; van Santen et al., 2019; van Santen et al., 2022). The annotations were added to the network using Cytoscape 3.10.0 software (Shannon et al., 2003).

## **Integration of Surface Metabolome and Surface Microbiota Datasets:**

### **Multi-omics approach**

LC-MS metabolomics (features) and metabarcoding (bacterial, eukaryotic and fungal ASVs) data for each of the *Saccharina latissima* epimicrobiota samples were correlated. Using the *mixOmics* package, we looked at how this dataset varied over time and as a function of the compounds added (Rohart et al., 2017).

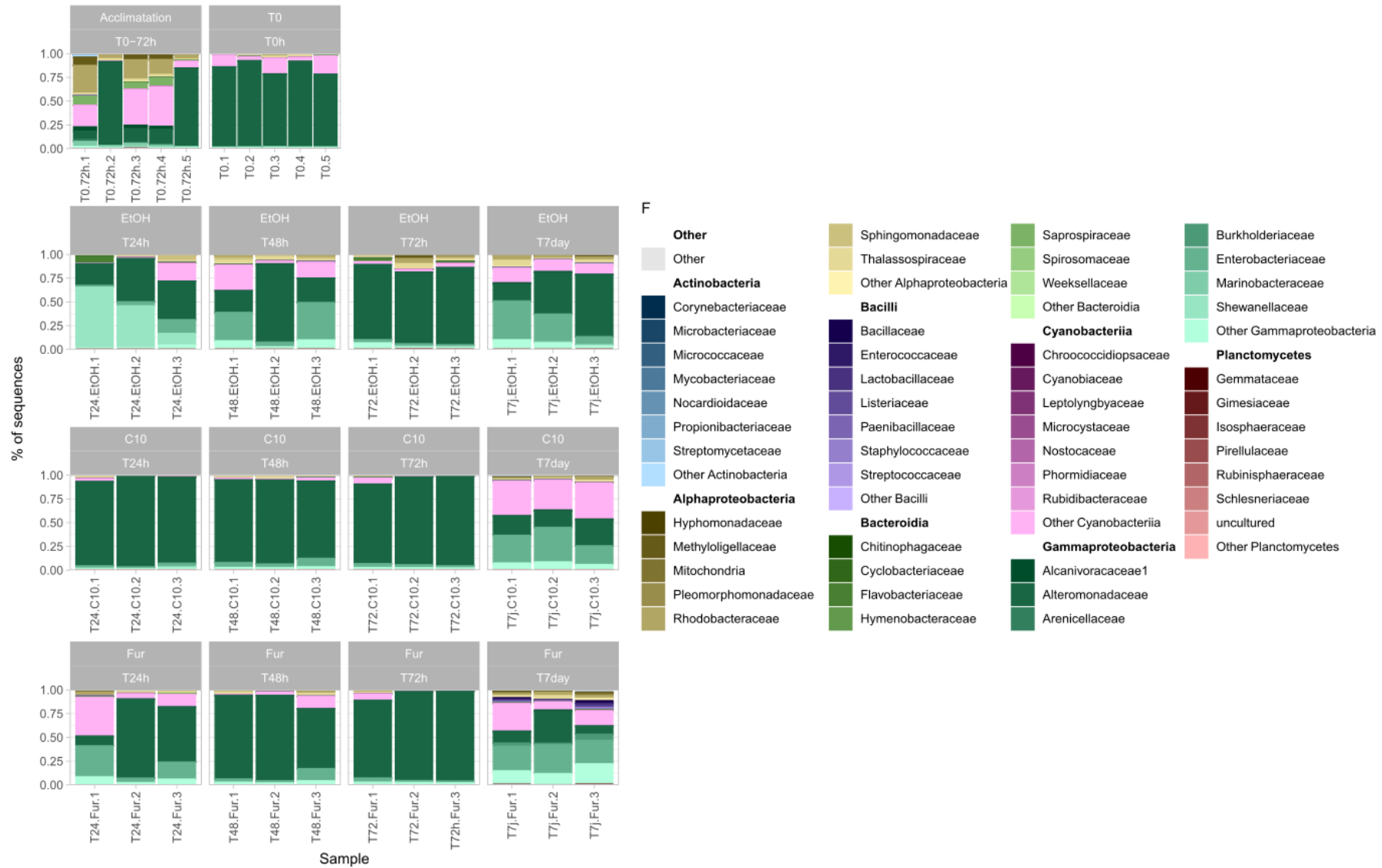
## Preliminary Results

### Selection of QS compounds concentrations

Young *Saccharina latissima* sporophytes were exposed to the QS compounds C10-HSL (QS circuits activators) and furanone C30 (QS circuits inhibitors). Furanone C30 was found to be significantly toxic to sporophytes from a concentration of 10  $\mu$ M ( $p$ -value <0.0001, Kruskal-Wallis's test), leading to sporophyte death within 12 hours (**Supp. Figure III.1**). At a concentration of 1  $\mu$ M, furanone had no significant effect on the Fv/Fm ratio ( $p$ -value > 0.5, Kruskal-Wallis's test). However, as a precautionary measure, this concentration was divided by 2 during experimentation. The addition of ethanol, the solvent for the added compounds, had no effect on *Saccharina latissima* sporophytes ( $p$ -value > 0.999, Kruskal-Wallis's).

### Effect of QS compounds on bacterial diversity

Bacterial diversity was studied using 16S rRNA sequencing. The results showed, first, a common pattern before acclimatization of the sporophytes in the bottles, and inter-individual variability: 1, 3 and 4 were similar, as were individuals 2 and 5 (**Figure III.1 and Supp. Figure III.2**). However, these 5 individuals were composed of the same bacterial classes, with Gammaproteobacteria at 90% abundance in individuals 2 and 5, compared with 20% in the others, followed by Alphaproteobacteria (12%), Cyanobacteriia (8%), Bacteroidia (2%), Actinobacteria (0.5%) and Planctomycetes (0.5%). After acclimatization in bottles, corresponding to T<sub>0</sub>, bacterial communities were very similar, with 90% Gammaproteobacteria of the genus *Paraglaciecola* sp., 5% Cyanobacteriia and 3% Alphaproteobacteria. After 24 h, the addition of EtOH led to an increase in the abundance of Shewanellaceae (43% vs. 0.1% at T<sub>0</sub>), but also Flavobacteriaceae (2% vs. 0.1%) and Sphingomonadaceae (1.5% vs. 0.05%). The addition of C6-HSL dissolved in EtOH had no effect on bacterial community abundance compared to T<sub>0</sub>. The addition of furanone resulted in a decrease in Alteromonadaceae (66% vs. 90%) and an increase in Enterobacteraceae (22% vs. 1%) compared with T<sub>0</sub>.



**Figure III.1:** Bacterial diversity at Class and Family level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit).

After 48h and 72h, the bacterial communities that had received C10-HSL and furanones had returned to the T0 community composition. Concerning sporophytes exposed to ethanol, had returned to the T0 state, after a transitional state at 48h composed of Enterobacteriaceae and Cyanobacteria, very similar to the epimicrobiota of sporophytes 24h after exposure to furanone. At 72 h, the bacterial communities in each condition were composed of the same bacterial genera, with 80% *Paraglaciecola* sp., 10% *Alteromonas* sp. and 1-2% *Thalassospira* sp.

After 7 days, the bacterial communities exposed to EtOH were composed of *Paraglaciecola* sp. (49% vs. 80% at T72h), *Escherichia-Shigella* sp. (10%), *Enterobacter* sp. (7%), *Alteromonas* sp. (5%) and *Thalassospira* sp. (5%). Communities exposed to AHLs were similar, with a clear decrease in *Paraglaciecola* sp. (27% vs. 82% at T72h), the detection of *Escherichia-Shigella* sp. (21%), *Enterobacter* sp. (16%) and *Klebsiella* sp. (4%), *Alteromonas* sp., *Citrobacter* sp. and *Thalassospira* sp. (2% each). Communities exposed to furanones were composed of the same communities as those exposed to C10-HSL, but with the emergence of the genera *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Ruegeria* sp. and *Vibrio* sp., with over 1% abundance compared with 0.05% at the other sampling times.

Diversity indices  $\alpha$  (Chao1, Shannon, Simpson) were calculated for all samples (**Supp Figure III.3**). The indices showed that bacterial diversity did not vary significantly between samples ( $p$ -value > 0.56, Kruskal-Wallis's test) except for the Shannon index of samples corresponding to the furanone condition after 7days, where bacterial diversity was higher than at T0h ( $p$ -value: 0.0369, Kruskal-Wallis's and Dunn's tests).

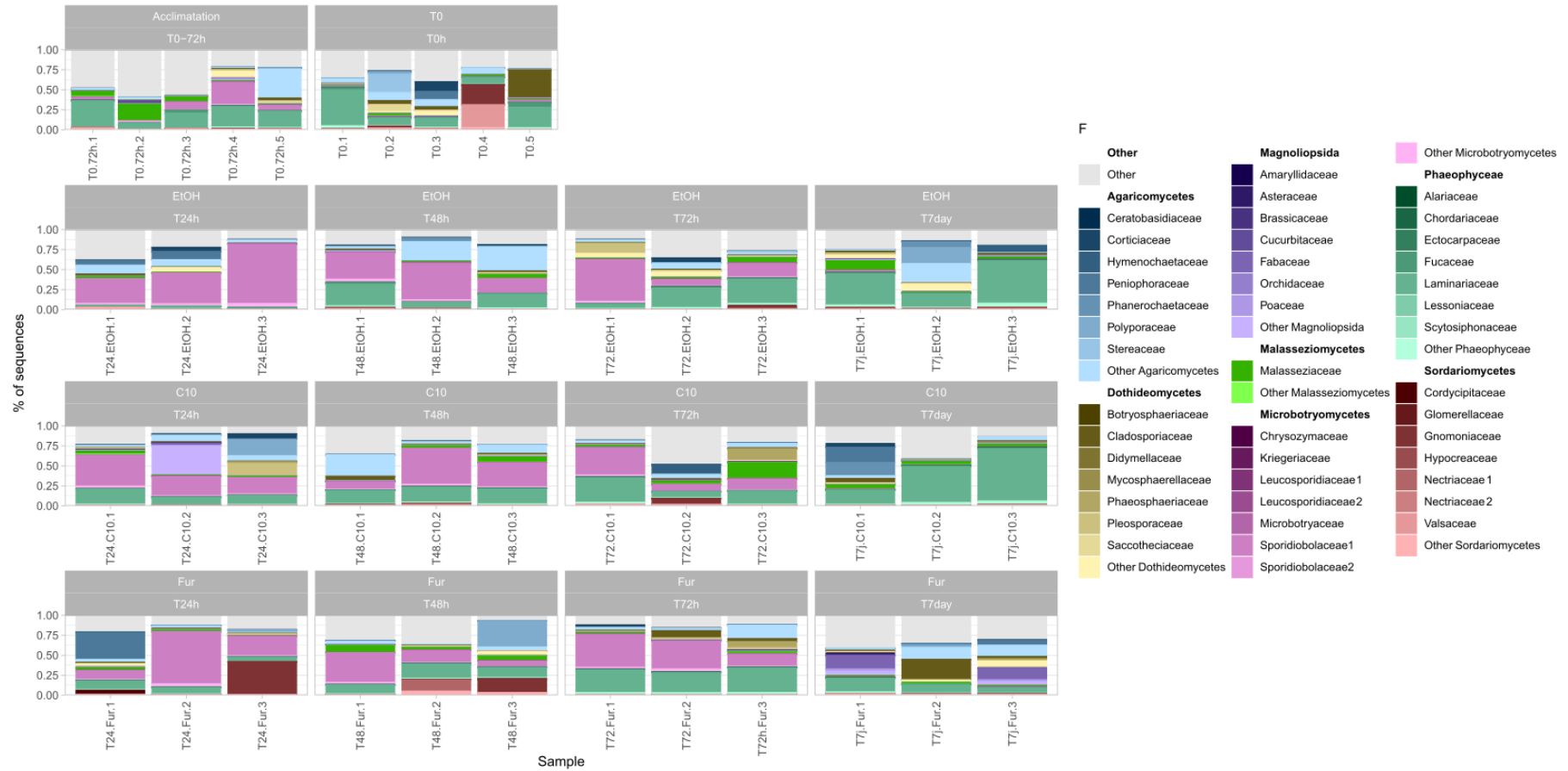
### **Effect of QS compounds on fungal diversity**

Fungal diversity was studied by sequencing the ITS fragment. However, detection of fungal communities was hampered by the large number of ITS sequences from *Saccharina latissima* (97%), which were particularly well detected with ITS primers (**Supp. Figure III.4**). OTU10, corresponding to *Saccharina* sp., and OTU11, corresponding to *Saccharina latissima*, were eliminated from the dataset to gain greater visibility of fungal OTUs. Fungal communities were particularly diverse, with high inter-individual variability (**Figure III.2**).

Before sporophyte acclimatization, fungal communities were composed of Basidiomycota (50%) and Ascomycota (48%), whereas at T0, Ascomycota were dominant with 65% against 31% Basidiomycota. Over the experimentation, from 24h to 72h, the dominant fungal phylum was Basidiomycota (75%) versus 15% Ascomycota in all conditions. After 7 days, the compositions were reversed, with Ascomycota predominating at 45% against 30% Basidiomycota. In bottles containing furanone, the difference was even more marked, with only 19% Basidiomycota. This variation in Basidiomycota came from the family of Sporidiobolaceae, genus *Rhodotorula sp.* which fluctuate in the same way (10-71% abundance). At T7days, they dropped sharply to less than 1% abundance.

The other genera present were highly variable from one epimicrobiota to another before acclimatization, during experimentation and even within a bottle over time. However, as *Rhodotorula sp.*, some species were particularly redundant at variable abundances, such as *Penicillium sp.* with between 0.1-5%, in all samples, *Cladosporium sp.* between 0.3-20%, *Malassezia sp.* between 1-20%, *Alternaria sp.* between 0.3-12% and *Aspergillus sp.* 0.1-3% (**Supp. Figure III.5**).

Diversity indices  $\alpha$  (Chao1, Shannon, Simpson) were calculated for all samples (**Supp Figure III.3**). The indices showed that fungal diversity did not vary significantly between samples (p-value > 0.19, Kruskal-Wallis's test) except for the Simpson index of samples taken after 7 days, the fungal diversity of samples exposed to furanone was higher than those exposed to C10-HSL (p-value: 0.0293, Kruskal-Wallis's and Dunn's tests).



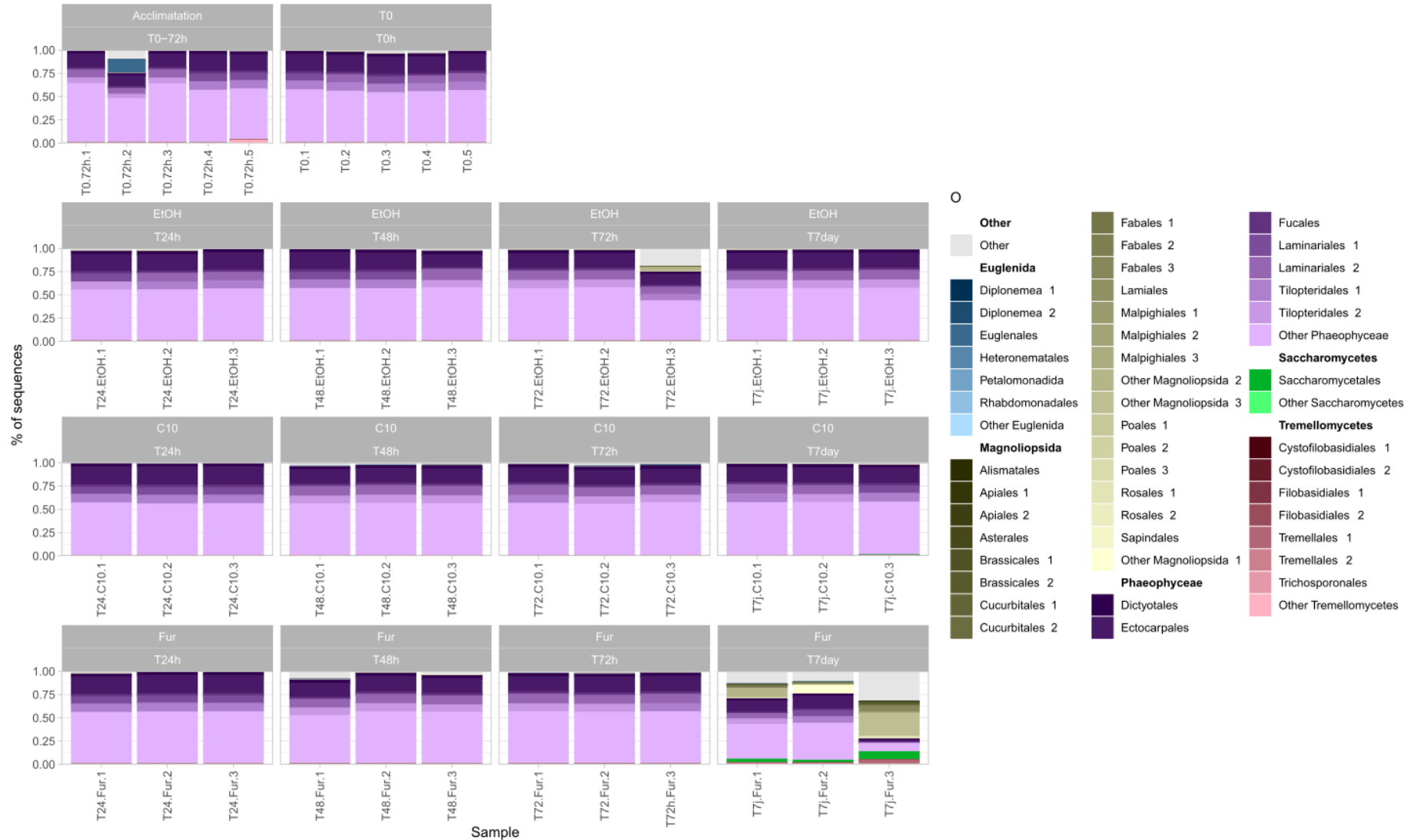
**Figure III.2:** Fungal diversity at the Class and Family level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit).

## Effect of QS compounds on eucaryotic diversity

Our study of the eucaryotic diversity by 18S rRNA sequencing of the epimicrobiota of young *Saccharina latissima*. This analysis revealed a high predominance of the Phaeophyceae class (97% of all sequences). The surface eucaryotic community of *Saccharina latissima* was composed of the order Ectocarpales (40%), Tilopteridales (15%), Laminariales (14%), Dictyotales (6.8%) and Fucales (5.2%) (**Figure III.3**). The most common genera were *Stchapovia* sp. (31% of all sequences), *Phaeosiphoniella* sp. (19%), *Halosiphon* sp. (9%), *Padina* sp. (2%) and *Laminaria* sp. (2%) (**Supp. Figure III.6**). These communities remained unchanged during acclimatization of the sporophytes in the bottles and were not affected by the addition of the compounds (EtOH control, C10-HSL and furanone C30) at 24h, 48 and 72h. After 7 days, in the bottles with furanone C30 added, the Phaeophyceae class collapsed (40% reduction), with Ectocarpales (50% reduction), Laminariales (50% reduction) and Tilopteridales (50% reduction). Families that emerged in this condition were Saccharomycetes (3%), Polychaeta (2%), Tremellomycetes (1.7%), Hydrozoa (1.5%) and Magnoliopsida (10%).

Diversity indices  $\alpha$  (Chao1, Shannon, Simpson) were calculated for all samples (Supp Figure 3). The indices showed that global eucaryotic diversity did not vary significantly between samples ( $p$ -value > 0.55, Kruskal-Wallis's test).

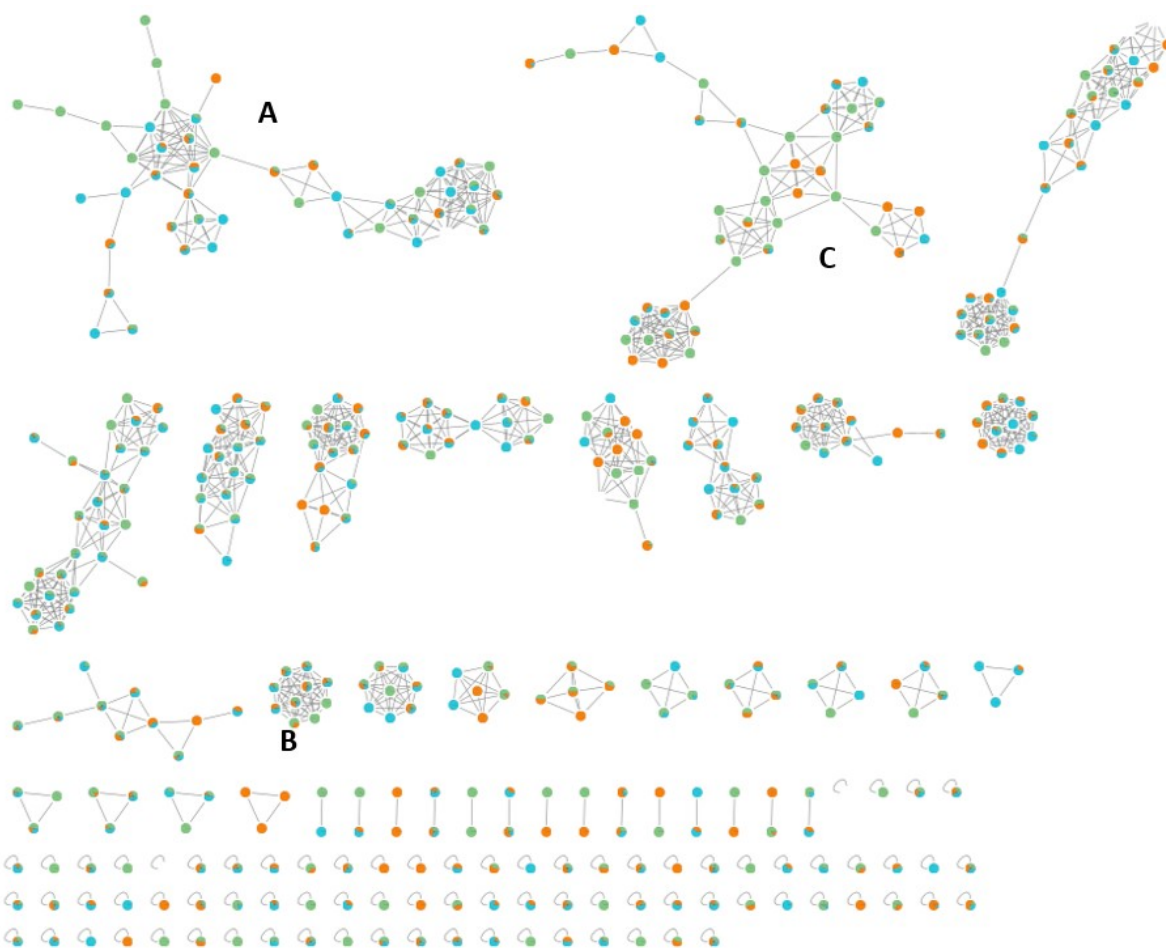




**Figure III.3 :** Eukaryotic diversity at the Class and Order level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit)

## Effect of QS on *Saccharina latissima* surface metabolomes

Surface metabolomes of young *Saccharina latissima* were analyzed by LC-MS/MS and revealed the presence of 422 total metabolites (**Figure III.4**). These metabolites are currently being annotated, but some clusters have already been identified as particularly interesting. Cluster A is composed of putative amino fatty acids, cluster B of putative QS compounds, certainly AHLs (other than those we added) and cluster C of putative diketopiperazines. We also identified putative antibiotics. Some of the metabolites present in the network are condition-specific (Control, C10-HSL, furanone C30), while others are also specific to sampling time.



**Figure III.4** : Molecular network (FBMN) of *Saccharina latissima* surface metabolomes without annotation. Legend: green - Control EtOH, blue - C10-HSL, orange - Furanone C30

## Discussion

### Diversity of the epimicrobiota of young *Saccharina latissima* sporophytes

We evaluated the bacterial diversity of young *Saccharina latissima* sporophytes grown in the laboratory. Indeed, the bacterial diversity of young algae is composed of Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, and Bacteroidia, that are rather typical of brown macroalgae and kelp (Andersen et al., 2011; Burgunter-Delamare et al., 2023; Tourneroché et al., 2020), but with variable abundance depending on individuals and culture conditions.

Indeed, when the sporophytes were separated from their culture and placed in the bottles (corresponding to T0), the bacterial communities had changed, notably with an increase in the abundance of *Paraglaucicola* sp. but all the bottles were made up of the same communities. This result suggests the possibility of a "default" microbiota, i.e. a specific microbiota that is established as soon as an environmental disturbance occurs. Such kind of "recovery systems" had already been evidenced in the red alga *Delisea pulchra* and in a seagrass (Longford et al., 2019; L. Wang et al., 2021), and we hypothesize that this phenomenon also exists in *Saccharina latissima*. Nevertheless, the predominance of *Paraglaucicola* sp., which seems to be involved in this potential "restoration system", is surprising. This cold-water (Arctic and Antarctic) bacterial genus is known to degrade the fucoidanes produced by brown macroalgae (Martin et al., 2015; Sánchez Hinojosa et al., 2018; Schultz-Johansen et al., 2021). Our study shows that they belong to the healthy microbiota of young algae grown in the laboratory. The presence of *Paraglaucicola* sp., which is not very abundant on wild-grown *Saccharina latissima* (Burgunter-Delamare et al., 2023), can be explained by observations carried out on *Delisea pulchra*, which showed that microbiota adapt to life in an aquarium (Zozaya-Valdes et al., 2015). In this case, an increase of the Alteromonadaceae family was observed, with a particularly strong abundance of *Glaucochloridium* sp., a genus genetically close to *Paraglaucicola* sp..

The fungal communities of the algal epimicrobiota have been little studied, and the functional role of fungi remains poorly elucidated. Our results show that fungal communities are particularly variable in young sporophytes, as in adults collected from the environment. However, communities were constituted by the same families and genera as in adults

(Adouane et al., submitted). In addition, community fluctuations between Basidiomycota and Ascomycota were observed, and can be explained by the presence of Sporidiobolaceae, notably *Rhodotorula sp.* who were particularly abundant from 24-72h. Known in cold-water macroalgae (Antarctica), *Rhodotorula sp.* are poorly studied fungi whose functional role is unknown (Loque et al., 2010; Ogaki et al., 2019). The study of surface metabolomes and correlations with microbial communities will certainly provide information on the role of these fungi within the algal epimicrobiota.

As for the other eukaryotes present on the surface of *Saccharina latissima*, the order Phaeophyceae is predominant, with Ectocarpales, Tilopteridales, Laminariales and Dictyotales. This colonization by brown macroalgae is consistent with the literature, which indicates that *Saccharina latissima* is regularly colonized by brown algae (Markussen Bjorbækmo et al., 2023; Peteiro and Freire, 2013). However, this predominance raises a series of questions regarding the transmission of Phaeophyceae during the production of young algae, as the cultures are then grown with sterile seawater. We hypothesis that Phaeophyceae are transmitted like bacteria and fungi, from parents in the environment to descendants capable of sustaining themselves through cultivation.

## **Effect of QS compounds on communities**

QS compounds caused a modification of the epiphytic communities associated with *Saccharina latissima*. Bacterial communities were notably impacted by the addition of furanone and ethanol, with the abundance of Enterobacteriaceae (22% vs 1% at T0) and Cyanobacteriia (18% vs 5% at T0) increasing after the addition of furanone, and Shewanellaceae (43% vs 0.1% at T0) after the addition of EtOH, resulting in a decrease in the abundance of Alteromonadaceae (*Paraglaciecola sp.*, 66% vs 90% at T0).

Moreover, the change in communities exposed to the EtOH control (solvent for the added compounds) as opposed to the C10-HSL condition (no change) is particularly intriguing. One hypothesis is that the ethanol disrupted microbial communities, but that within the C10-HSL condition, communities were restored by the addition of QS compounds (“rescue” mechanism). To validate this hypothesis, it will necessary to look in detail at the metabolomics results, to explain the complex effect of QS compounds on bacterial communities after 24h of exposition.

Under all conditions, this disruption of bacterial communities was restored within 24h to 48h after the addition of compounds. These results again echo the work conducted on *Delisea pulchra* (Longford et al., 2019; Zozaya-Valdes et al., 2015), and support the hypothesis of the existence of a “restoration system” in *Saccharina latissima*. However, after 7 days, the presence of furanone led to the appearance of potentially algal-pathogenic genera such as *Bacillus* sp., *Vibrio* sp., and *Rugueria* sp. (Case et al., 2011; Egan et al., 2014; Goecke et al., 2010; Kumar et al., 2016). Inhibition of QS compounds could thus have a long-term effect on the microbiota. The surface fungal diversity of furanone-exposed algae was also altered, and the results showed that this diversity was significantly higher than at T0. Eukaryotic communities in general (18S rRNA dataset) were also affected, with Phaeophyceae in particular decreasing after 7 days under furanone conditions. Furanone-induced QS inhibition could also have a direct or indirect effect on fungal and eukaryotic communities. Metabolome analysis will allow us to decipher the effects of QS compounds on the microbiota, and to see the potential interactions between microorganisms, enabling rapid restoration of communities, but also the potential deterioration of the microbiota after 7 days in the presence of furanone.

## **Acknowledgments**

We would like to greatly thank Arul Marie and Remy Puppo for acquiring MS/MS spectra on the mass spectrometry technical platform. We would like to thank Rosella Biosystem for carrying out the sequencing and assigned the metabarcoding sequences (<https://rosella-biosystem.com/> ). We are grateful to the Bio2Mar platform (<http://bio2mar.obs-banyuls.fr> ) part of EMBRC-France supported by the Investments of the Future program (ANR-10- INSB-02), for its technical assistance and support. This work was financially supported by the Institute of Environmental Transition of Sorbonne University (SU-ITE) to EA and the Thematic Action of the National Museum of Natural History (ATM).

## **Author contributions**

EA and SR performed the experiments. EA, CH, RL and SP performed the analysis. EA, SR, CL, SP and RL designed the project. EA, RL and SP wrote the manuscript.

## **Declaration of interests**

The authors declare no competing interests.



Chapitre IV. Importance du quorum sensing  
dans les interactions du microbiote  
cultivable de *S. latissima*







## Avant-Propos

Les interactions entre microorganismes au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* restent largement inexplorées, alors que la production de médiateurs chimiques spécifiques est importante pour le maintien de l'homéostasie hôte-microbiome. Dans cette étude, par des approches de culture des souches bactériennes et fongiques présentes à la surface de l'algue, nous avons exploré la diversité et le rôle des mécanismes de communication cellulaire de type quorum sensing (QS) dans ces interactions. Nous avons combiné une analyse en LC-MS des souches fongiques et des biotests sur les souches bactériennes et fongiques pour évaluer et comprendre le rôle du QS dans la régulation du biofilm de surface.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article de recherche soumis dans la revue iScience de Cell Press. Les références bibliographiques citées dans cet article sont indexées à la fin du manuscrit. La partie Supplementary Information figure dans les **Annexes du Chapitre IV** et les figures supplémentaires dans les Annexes électroniques correspondantes.



## Article: Importance of quorum sensing crosstalk in the brown alga *Saccharina latissima* epimicrobiota

Emilie Adouane<sup>1,2</sup>, Camille Mercier<sup>2</sup>, Jeanne Mamelie<sup>2</sup>, Emma Willocquet<sup>2</sup>, Laurent Intertaglia<sup>3</sup>, Bertille Burgunter-Delamare<sup>4</sup>, Catherine Leblanc<sup>4</sup>, Sylvie Rousvoal<sup>4</sup>, Raphaël Lami<sup>2\*\*</sup> and Soizic Prado<sup>1\*+</sup>

<sup>1</sup>*Muséum National d'Histoire Naturelle, Unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-Organismes MCAM, UMR 7245, CNRS, Sorbonne Université, 75005 Paris, France*

<sup>2</sup>*Sorbonne Université, CNRS, UAR 3579 Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes LBBM, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France*

<sup>3</sup>*Sorbonne Université, CNRS, Bio2Mar, Observatoire Océanologique, 66650 Banyuls-sur-Mer, France*

<sup>4</sup>*Biologie Intégrative des Modèles Marins, LBI2M (Sorbonne Université/CNRS), Station Biologique de Roscoff (SBR), 29680 Roscoff, France.*

\*co-last authors

+ : corresponding authors: [soizic.prado@mnhn.fr](mailto:soizic.prado@mnhn.fr) and [raphael.lami@obs-banyuls.fr](mailto:raphael.lami@obs-banyuls.fr)

## Highlights

- The epimicrobiota of the brown alga *S. latissima* displays high microbial and chemical diversity.
- The algal epimicrobiota is the seat of intense and multidirectional cell–cell communication.
- Among cell-cell communication mechanisms, quorum sensing (QS) and anti-QS processes occurring in both fungi and bacteria, appear to be of major importance.
- Algal epimicrobiota is a source of bioactive compounds, including potential new antifouling compounds relying on anti-QS properties.

## Subject areas

Macroalgae, Laminariales, holobiont, biofilm, quorum sensing, metabolites

## Abstract

Brown macroalgae are colonized by diverse microorganisms which can affect the physiology of their host. However, cell-cell interactions within the surface microbiota (epimicrobiota) remain largely unexplored, while the production of specific chemical mediators is important for the maintenance of host-microbiome homeostasis. In this study, by combining LC-MS analysis and bioassays, we demonstrated that the widely diverse fungal epimicrobiota of the brown alga *Saccharina latissima* (Linnaeus) CE Lane, C. Mayes, Druehl et GW Saunders can affect quorum sensing (QS), a type of cell-cell interaction, as well as bacterial biofilm formation. We also showed the ability of the bacterial epimicrobiota to form and inhibit biofilm growth, as well as to activate or inhibit QS pathways. Overall, we demonstrate that QS and anti-QS compounds produced by the epimicrobiota are key metabolites in these brown algal epimicrobiota communities and highlight the importance of exploring this epimicrobiota for the discovery of new bioactive compounds, including potentially anti-QS molecules with antifouling properties.

## Introduction

Brown macroalgae play a crucial role in temperate coastal ecosystems by serving as vital habitats and nutrient sources for many organisms, making a substantial contribution to local biodiversity (Schiel and Foster, 2006; D. R. Schiel and Lilley, 2007). Currently, the macroalgae industry is undergoing notable expansion, particularly in sectors such as agriculture (McHugh, 2003; Peteiro, 2018), aquaculture (Roussel et al., 2019), pharmacology (Apostolova et al., 2020; Prasedya et al., 2022) and cosmetics (Catarino et al., 2023; Zheng et al., 2022). Additionally, brown algae might be valuable sources of energy and biofuel (Sasaki and Yoshikuni, 2022; Sharmila et al., 2021; D. Wang et al., 2016). Like many eukaryotes, brown macroalgae harbor a diverse range of microorganisms that exert a significant influence on their growth, morphogenesis, and nutrition (Egan et al., 2013; Singh et al., 2015; Singh and Reddy, 2016; Wahl et al., 2012). These multiple and specific interactions led therefore to define macroalgae and their associated microbiome as a “superorganism,” called the holobiont (Egan et al., 2013). These interactions are finely regulated by the production of chemical mediators that control the maintenance of host-microbiome homeostasis and thus contribute to the health status of the host (Burgunter-Delamare et al., 2023; Coelho-Souza et al., 2017; Dittami et al., 2016; Goecke et al., 2010).

The surface of macroalgae is colonized by a microbial community, a biofilm-like epimicrobiota, known as a “second skin” (Wahl et al., 2012), which is the site of chemical interactions and ecological processes. However, our understanding of the nature, diversity, and ecological roles of chemical signals within this biofilm remains incomplete. Bacteria within the epimicrobiota have been the subject of numerous studies (Dogs et al., 2017; Goecke et al., 2010; Lachnit et al., 2013, 2011, 2010; Salaün et al., 2012). These bacteria have been found to produce antimicrobial and antifouling compounds, enabling algae to defend themselves against pathogens (Dahms and Dobretsov, 2017; Ismail et al., 2016; Wiese et al., 2009b).

Conversely, the role of fungi within the holobiont has been relatively understudied, with only a few studies specifically focusing on brown macroalgal endophytes (Debbab et al., 2012; Fries, 1979). For instance, Vallet et al. demonstrated that fungal endophytic metabolites play a key role against protist pathogens in various brown algae including *Saccharina latissima* (Vallet et al., 2018). In addition, some endophytic fungi associated with brown macroalgae

also display significant production of antibiotic, antifungal, antioxidant and larvicidal compounds (Fan et al., 2019; Flewelling et al., 2013b, 2013a; Sarasan et al., 2017). A number of studies have shown that epiphytic fungi are also able to synthesize secondary metabolites that contribute to algal health (Harvey and Goff, 2010; Loque et al., 2010; Zuccaro et al., 2008, 2003). However, the molecular characterization of interspecies interactions between bacteria and fungi within this complex network remains largely unexplored.

Quorum sensing (QS), a coordinated response of a microbial population based on the production of chemical signals, also known as autoinducers (AI), plays a key role in biofilm formation and maintenance (Fuqua et al., 1994; Neilson, 1977; Schulz, 2014). As cell density increases, autoinducers accumulate until they reach a threshold that triggers the activation or repression of numerous genes regulating phenotypes such as adhesion, virulence, colonization or even the motility of microorganisms (Diggle et al., 2007; Parsek and Greenberg, 2005; Whiteley et al., 2017). Various types of autoinducers are already known. Some have been found in only one bacterial genus, whereas others, such as N-acyl homoserine lactone, type 1 (AI-1) or furanosyl borate diester, type 2 (AI-2), are present in various bacterial genera (Bassler, 1999; Henke and Bassler, 2004; Miller and Bassler, 2001). Strikingly, quorum signals are not exclusively produced by bacteria. Fungi are also able to regulate their morphogenesis, pathogenicity, biofilm formation and dispersal through QS mechanisms (QSM) involving compounds such as farnesol, phenylethanol and tryptophol (Mallick and Bennett, 2013; Martin, 2019; Padder et al., 2018; Wongsuk et al., 2016). Some of these compounds are involved in cross-kingdom signaling, enabling bacteria and fungi to regulate each other via specific compounds (Bamford et al., 2009; Chang et al., 2019b; Lee et al., 2007). Additionally, cross-kingdom signaling is also modulated by quorum sensing inhibitors, i.e., quorum quenchers (Grandclément et al., 2016; Rolland et al., 2016). To date, halogenated furanones produced by the red macroalga *Delisea pulchra* are the best-known bacterial QS inhibitors and enable it to regulate bacterial colonization (Campbell et al., 2011; De Nys et al., 1995; Harder et al., 2012).

Our group reported that bacterial and fungal endophytes associated with brown algae (*Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata*, *Laminaria digitata*, and *Saccharina latissima*) produce metabolites that interfere with bacterial autoinducer-2 quorum sensing (QS), a key cell-cell signaling system implicated in virulence and host colonization (Tourneroché et al.,

2019). However, the role of QS in regulating interactions between microorganisms associated with brown macroalgae remains poorly investigated especially on the surface of the algae, the site of complex biofilms.

This study aimed to investigate the molecular interactions occurring among microorganisms within the *Saccharina latissima* epimicrobiota. We first isolated and identified the bacterial and fungal strains present in the algal epimicrobiota. Subsequently, the metabolomes of the fungal strains were analyzed by using LC-MS/MS. To explore the role of QS in these interactions, we evaluated the ability of fungi to inhibit QS and bacterial biofilm formation. Furthermore, we assessed the bacterial strains' capacity to form and inhibit biofilms, as well as produce and inhibit QS compounds. Overall, our findings suggest that QS compounds, whether they are activators or inhibitors, produced by the cultivable microbiota of *S. latissima* play an essential role in the complex network of interactions within the algal holobiont.

## Materials and methods

### Sampling and isolation of epiphytic microbial strains

Fungi and bacteria were previously isolated from the brown alga *S. latissima* located in Perharidy (48°43'47.0 "N 4°00'17.1 "W), Roscoff, France, in January and June 2021. During low tide (coefficients 93 and 101), six young and healthy (without visible damages) *Saccharina latissima* individuals (<1 m) were randomly collected and placed in sterile plastic bags. The six individuals were promptly transported to the laboratory in a cooler at approximately 4 °C and stored in a cold storage room until sampling (maximum 2 hours) (Burgunter-Delamare et al., 2022).

To extract the microbial community, each alga was rinsed with sterile seawater, and the microbial samples were obtained by scraping with a scalpel and then swabbing (Bengtsson and Øvreås, 2010). The swabs were then placed in 2 ml Eppendorf tubes containing sterile seawater and vortexed for 2 min. Serial dilutions of the samples were made in Eppendorfs tubes up to 10<sup>-4</sup> dilution (Romani et al., 2021). Subsequently, 20 µL of each sample (from 10<sup>0</sup> to 10<sup>-4</sup> dilutions) were spread with a rake on Petri dishes. For the first sampling (January 2021), the isolation culture media used were MA (marine agar, BD Difco) and R2A (BD Difco)



with 100% natural seawater (NSW) for bacterial strains. For fungal strains, PDA (potato dextrose agar, BD Difco) with 75% NSW and MEA with 75% NSW were used (Vallet et al., 2018). The composition of MEA is as follows: 20 g of malt extract (BD Difco), 20 g of glucose (Sigma Aldrich), 1 g of Bacto peptone (BD Difco), 20 g of agar-agar (Sigma Aldrich) for 1 L. During the second sampling (June 2021), the samples were only spread on MEA 75% and PDA 75%, both containing 1 g/L kanamycin (kanamycin sulfate from *Streptomyces*, Sigma Aldrich) and 1 g/L penicillin G (benzylpenicillin, Sigma Aldrich) and then incubated at 18 °C in the dark (Henríquez et al., 2014; Li and Wang, 2009).

The cultures were subsequently maintained at 18 °C in the dark until new colonies stopped appearing on the Petri dishes. Each colony was isolated and purified based on their distinct morphotypes on their respective media (Blanchet et al., 2017). The microbial strains were stored at -80 °C in cryotubes. For bacteria, cryopreservation medium consisting of liquid cultures with 35% glycerol was used, while for fungi, agar pieces were plated in cryotubes with 715 µL of PDA 75% NSW and 215 µL of 70% glycerol.

### **Taxonomic identification of bacterial and fungal epiphytic strains**

The 42 fungal isolates were identified using routine protocols based on ITS sequencing (Blanchet et al., 2017; Romani et al., 2019; Vallet et al., 2018) without any modification. Agar pieces from each fungal strain were collected and placed into ZR BashingBead™ Lysis tubes from the Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research). PCR amplification of the ITS fragment was carried out using the following primers: ITS1F (3'-AGGAGAAGTCGTAACAAGGT-5'; 10 µM) and ITS4R (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5'; 10 µM). The PCR products were purified using the Agencourt AMPure XP kit according to the manufacturer's instructions. The sequencing reaction was performed using BigDye Terminator technology (Nimagen), and the resulting products were cleaned using the Agencourt CleanSeq kit following the manufacturer's instructions. Sanger sequencing was performed with the Sanger AB3130xl 16-capillary sequencer (Applied Biosystems) on the Bio2Mar platform (Observatoire Oceanologique, Banyuls-sur-Mer, France). ITS gene sequences were trimmed, double checked manually, and dereplicated using the package Staden-GAP4 (Staden et al., 2003). Each FASTA file was uploaded to Mycobank (<https://www.mycobank.org/>) or Unite (<https://unite.ut.ee/>) and compared with the cultured fungal strain databases using BLAST.

For the 272 bacterial isolates, DNA was extracted and sequenced by the company Genoscreen. Their two pairs of primers were used: 1040R-1040F and P8-PC535. The results were received as .ab1 and .seq files containing the unassigned sequences. Subsequently, phylogenetic affiliations were manually annotated on EZBioCloud (<http://ezbiocloud.net/>) using BLAST. All sequences were submitted to NCBI (ITS sequences, accession numbers OR461711 to OR461752, 16S rRNA sequences, accession numbers OR491302 to OR491573) in BIOPROJECT PRJNA1010225.

All sequences (fungi and bacteria) were aligned using Muscle implemented in MEGA 11 (Kumar et al., 2016; Tamura et al., 2021). The alignments were manually reviewed for any mismatches, and a phylogenetic tree was constructed using a maximum composite likelihood tree with the Kimura 2-parameter Model (K2), G+I model, and nearest-neighbor-interchange and neighbor-joining methods (Kimura, 1980; Tamura et al., 2021). The reliability of each node in the tree was assessed by bootstrapping over 500 replicates. The phylogenetic tree was then exported in Newick format and processed on the iTOL online platform, where the biotest data were incorporated.

### **Culture of strains**

Bacterial strains were inoculated with 50  $\mu$ L (from cryotube) in glass tubes containing 5 ml of MB (Marine Broth, BD Difco) for 24 h at 18 °C. For the AHL inhibition tests (short chain-HSL and long chain-HSL), the bacterial strains were cultured with 1  $\mu$ M (C6-HSL or 3-oxo-C10-HSL) corresponding to the specific biotest being conducted. Fungal strains were inoculated with 3 pieces of agar (1 cm<sup>2</sup>) from Petri dish cultures. The fungal strains were grown at 18 °C for 7 days in 50 ml of PDB 75% NSW (Potato Dextrose Broth, BD Difco) and liquid MEA 75% NSW without agar (see previous).

### **Fungal and bacterial supernatants**

Bacterial supernatants were obtained after sampling 2 ml of culture from glass tubes and centrifuged at 10,000 x g for 10 min. The resulting supernatant was stored at -80 °C until further use for the biotests. Fungal supernatants were obtained after 7 days of growth, and 25 ml of culture was sampled and centrifuged at 10,000 x g for 30 minutes. The supernatant was then filtered through 4  $\mu$ m and 0.2  $\mu$ m filters. The filtered fungal supernatants were stored at -80 °C for subsequent analysis.

Fungal metabolomes were extracted from the supernatants by the addition of 25 mL of ethyl acetate to 25 ml of supernatant and were then shaken overnight at 25 °C. Subsequently, the ethyl acetate phase was carefully collected using a Pasteur pipette and transferred to preweighed hemolysis tubes. The collected ethyl acetate phase was evaporated to dryness and the resulting dry mass of each sample was recorded. Sterile culture media (liquid MEA and PDB) was also extracted using the same method. The samples were then stored at -20 °C until further analysis.

### **LC-MS-Based Metabolomic Analysis of fungal strains**

The dried extracts of fungal supernatant were solubilized in methanol at a concentration of 10 mg.mL<sup>-1</sup> and injected in HPLC-MS/MS. The analysis was performed in one batch and in a random sequence, with five samples followed by three quality controls (QCs), according to established protocols (Tourneroché et al., 2019; Vallet et al., 2018). The separation was carried out using a C18 Acclaim™ RSLC PolarAdvantage II column (2.1 × 100 mm, 2.2 µm pore size; Thermo Fisher Scientific, United States) connected to a Dionex Ultimate 3000 HPLC system. The column was coupled to a Maxis IITM QTOF mass spectrometer (Bruker, United States) equipped with an electrospray ionization source. The flow rate was set at 300 µL.min<sup>-1</sup>. The MS parameters were 3.5 kV of electrospray voltage, 35 psi of nebulizing gas (N<sub>2</sub>) pressure, drying gas (N<sub>2</sub>) flow rate of 8 L.min<sup>-1</sup>, and 200°C of drying temperature. The mobile phases were water (0.1% formic acid) and acetonitrile (0.1% formic acid, solvent B) following a gradient of Solvent B at 5, 50, 90, and 5% for 0, 9, 15, and 21 min, respectively.

LC-MS/MS data were analyzed using DataAnalysis (version 4.4 Bruker Daltonik GmbH) and converted to “.mzXML”. The LC-MS/MS data were preprocessed on MzMine 3.2.8 (Pluskal et al., 2010; Schmid et al., 2023) with a noise level of 1E3 for MS1 and 1E2 for MS2, and the ADAP chromatogram was built with a minimum group size of scan of 2, a group intensity threshold and minimum highest intensity at 3E3 (Myers et al., 2017). The chromatograms were resolved with ADAP Module Disclaimer with S/N threshold at 10, minimum feature height at 1, coefficient/area threshold at 10, 0.02-1.00 for peak duration range and 0.10-0.50 for RT wavelet range. The data were then deisotoped and filtered to only keep peaks with MS2 scans and a RANSAC alignment was performed. After alignment, the compounds in the culture media (MEA and PDB) were subtracted from the matrix using the "blank subtraction" tool.

This step eliminates the compounds present in the culture media from the dataset. The data were then exported to FBMN-GNPS to build a molecular network with a cosine of 0.7 and 4 minimum matched fragment ions, precursor ion mass tolerance (PIMT) and fragment ion mass tolerance (FIMT) at 0.05 Da (Nothias et al., 2020; M. Wang et al., 2016). Metabolites were annotated with various GNPS tools, including Library Search, Dereplicator, Dereplicator + (Mohimani et al., 2018), and Sirius 5.6.3 (Dührkop et al., 2019) using the tools Molecular formula identification, ZODIAC, CSI:FingerID, and CANOPUS (Djoumbou Feunang et al., 2016; Dührkop et al., 2021, 2015; Hoffmann et al., 2021; Kim et al., 2021; Ludwig et al., 2020). Furthermore, molecular formulas were deduced from HRMS  $m/z$  values and subsequently searched and annotated using the natural products databases NPAtlas, MarinLit, and LOTUS (Rutz et al., 2022; van Santen et al., 2019; van Santen et al., 2022). The annotations were thus added to the network using Cytoscape 3.10.0 software (Shannon et al., 2003).

### **Quorum sensing bioassay: detection of production and inhibition of AI-1 and AI-2**

To detect AI-1 and AI-2, a set of biosensors was employed, considering the diversity of quorum sensing compounds. *Pseudomonas putida* F117 (pRK-C12; Kmr; ppul::npt) was used to detect long acyl chain AHLs (>8 carbons in the acyl side chain) (Andersen et al., 2001), while *Escherichia coli* MT102 (pJBA132) was utilized for medium-chain AHLs ( $\leq 8$  carbons in the acyl side chain) (Riedel et al., 2001). For the detection of short-chain AHLs (ranging from C4-HSL to C8-HSL), *Chromobacterium violaceum* CV026 was employed in liquid media (McClean et al., 1997). *Vibrio harveyi* MM32 (luxN::Cm, luxS::Tn5Kan) was used to detect the presence or inhibition of AI-2 in the culture supernatants or fungal extract (Bassler et al., 1993; Freeman and Bassler, 1999; Tourneroché et al., 2019). The experimental protocols used in this study were routine protocols previously published by our laboratory and are presented in the Supplementary Materials and Methods section (Blanchet et al., 2017; Doberva et al., 2017; Romani et al., 2021; Tourneroché et al., 2019). In brief, the culture supernatants of bacterial strains or fungal extracts at 1 mg/ml in DMSO (10%) were incubated with the respective biosensors, either in the presence or absence of AHLs or DPD (a precursor of AI-2). After incubation, depending on the biosensor strain, the growth and QS phenotypes, including changes in fluorescence, purple coloring, or bioluminescence, were measured. Detailed protocols can be found in Supp. Materials and Methods.

## Evaluation of bacterial biofilm-forming capacity

The biofilm-forming capacity of bacterial strains in the collection was assessed following previously described protocols (Blanchet et al., 2017; Stepanović et al., 2000). The strains were grown in microplates at 18 °C for 5 days. After measuring the OD<sub>630nm</sub> with a Victor 3 spectrofluorometer (Perkin Elmer®), the microplates were rinsed with PBS, dried, and then treated with crystal violet (0.2% Sigma, diluted in 20% ethanol) for 15 min in the dark at room temperature. Subsequently, the microplates were rinsed with water (three times) and the wells were decolorized with a decolorizing solution (33% glacial acetic acid) to reveal the presence of biofilm. The OD<sub>540nm</sub> was measured with a spectrofluorometer.

## Biofilm inhibition

To evaluate the capacity of microbial strains to inhibit biofilm formation, two reference strains were used: *Vibrio harveyi* and *Labrenzia* sp. BBCC2184, which were obtained from our laboratory collections. These strains were grown in 48-well microplates (900 µL) at 25°C in MB, in the presence of 100 µL of bacterial supernatants for 48h before biofilms revelation (as described above). For inhibition testing of biofilm formation by fungal metabolomes, 950 µL of bacterial strains was incubated with 50 µL of fungal extract at a concentration of 1 mg/ml in DMSO (10%) to limit the potential toxicity of fungal strains. The biofilm inhibition test was performed following the same procedure as that for biofilm formation (as described above).

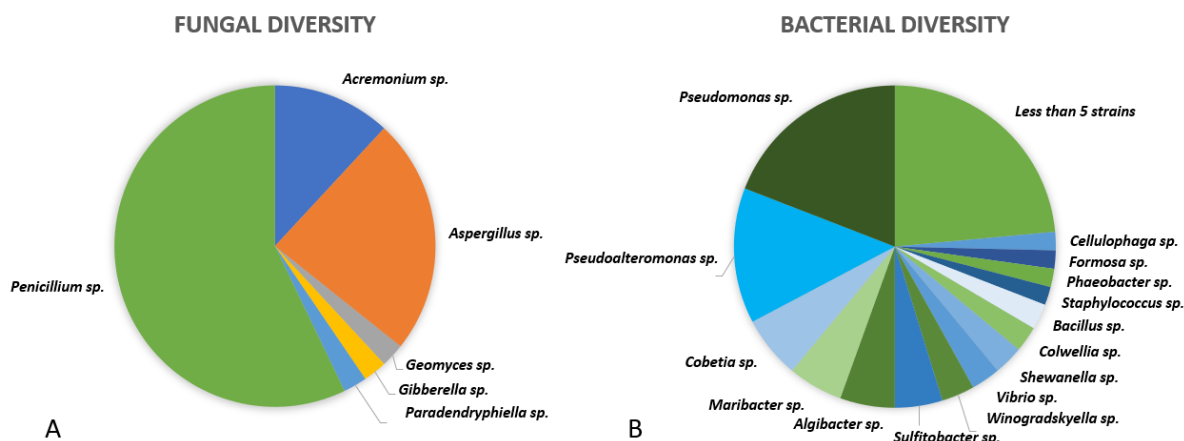
The results of the bioassays were analyzed, and the details of the calculations can be found in Supplementary Materials and Methods. Statistical tests (Mann-Whitney tests) were performed using GraphPad Prism 8. The resulting data were transformed into a binary dataset and incorporated into the phylogenetic trees using the iTOL online platform.

## Results

### Cultivable fungal and bacterial diversity from *S. latissima* epimicrobiota

Fungal strains were isolated on two culture media (MEA 75% NSW and PDA 75% NSW) to maximize cultivable diversity. Forty-two fungal strains were obtained (Supp Table 1). Among the fungal strains, 100% were affiliated with Ascomycota (95% Sordariomycetes, 2% Dothideomycetes and Leotimycetes). The cultivable fungal epimicrobiota contained 10 different species (Figure 1A), including many *Penicillium* sp. (57%), *Aspergillus* sp. (24%) and a few *Acremonium* sp. (12%). The singletons were *Geomyces pannorum*, *Gibberella intricans* and *Paradendryphiella salina*.

A total of 272 bacterial strains were isolated on marine agar from the epimicrobiota of *S. latissima* (Figure IV.1B, Supp Table IV.2) and classified, based on their 16S rRNA gene sequences, into 4 phyla, 6 classes, 13 orders, 24 families, 48 genera with 16 taxonomically unique units. The most abundant phyla were Pseudomonadota (formerly known as Proteobacteria, 61%), Bacteroidota (Bacteroidetes, 24%), Bacillota (Firmicutes, 10%) and Actinomycetota (Actinobacteria, 5%). Among Pseudomonadota, Gammaproteobacteria were the most abundant (51%), while Alphaproteobacteria (8.8%). The Flavobacteriaceae family was the most represented one (23% of total sequences), including *Algibacter* sp. (5%), *Maribacter* sp. (5%) and *Winogradskyella* sp. (3%), as well as *Cellulophaga* sp., *Dokdonia* sp. and *Zobellia* sp.. The Pseudomonadaceae and Pseudoalteromonas families were composed of *Pseudomonas* sp. (19%) and *Pseudoalteromonas* sp. (13%). Bacillaceae (7%) and Rhodobacteraceae (8%) families were also well-represented with the genera *Bacillus* sp. (2.5%), *Brevibacterium* sp., *Cytobacillus* sp., *Priesta* sp., *Sulfitobacter* sp. (4.7%) and *Phaeobacter* sp.. Members of Halomonadaceae (6.25%), Shewanellaceae (3%), Colwelliaceae (2.5%) and Vibrionaceae (2.5%) families were also isolated. This high bacterial diversity was confirmed by the fact that 24% of the collection is represented by strains present in less than 5 isolates of the same genus, including 16 corresponding to a single strain.



**Figure IV.1:** Fungal and bacterial cultivable diversity from the epimicrobiota of *S. latissima*. **(A)** fungal diversity at the genus level of the 42 strains isolated **(B)** bacterial diversity at the genus level of the 272 strains isolated

### Diversity of metabolites involved in microbial interactions produced by fungal strains isolated from the epimicrobiota of *S. latissima*

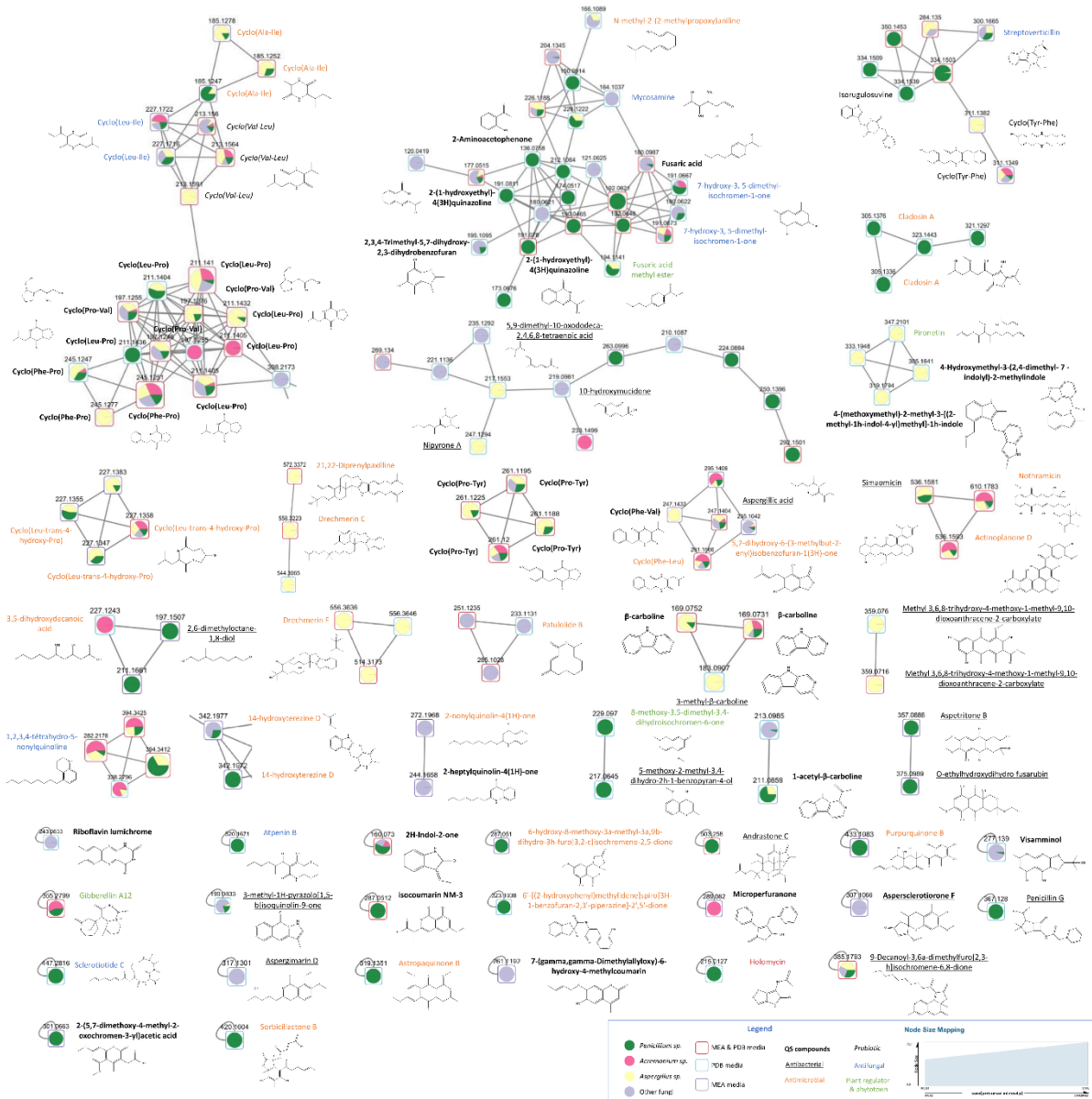
The metabolomes of 42 fungal strains isolated from the epimicrobiota of *S. latissima* grown in MEA and PDB were analyzed by LC-MS/MS. After data processing, 1442 features were obtained in MS (data not shown) and 573 in MS/MS (**Supp Table IV.3**). The molecular network formed by the 573 metabolites is shown in Supp Figure 1 and comprises amino acids (18.8%), numerous fatty acyls and derivatives (16.5%), terpenoids (4%), prenol lipids (3%) and indoles (3%) (**Supp Table IV.3**). Among the putatively annotated metabolites (**Supp Table IV.3**), those potentially involved in microbial interactions (17.4%, 99 metabolites) based on the literature (**Supp. Table IV.4**) have been grouped in **Figure IV.2** in the form of a subnetwork.

Within this subnetwork, amino acids and derivatives were particularly predominant, with 39 putative compounds including 36 cyclodipeptides. The results also highlighted a wide range of compounds produced, including putative antibacterials (18), such as aspergillic acid (Dutcher, 1958), penicillin G (Chandel et al., 2008), simaomicin (Maiese et al., 1990), nothramicin (Momose et al., 1998), and 3-methyl-1H-pyrazolo[1,5-b]isoquinolin-9-one (Cruz et al., 1996) or O-ethylhydroxydihydrofusarubin (Gerber and Ammar, 1979). The fungal strains also produced putative antifungals (10), such as *cyclo*(phe-pro) described above (Wang, 2012), streptovercillin (Feng et al., 2007), and mycosamine (Paquet and Carreira, 2006), as well as more general antimicrobials (26), such as astropaquinone B (Wang et al., 2009), atpenin B (Kumagai et al., 1990), 7-hydroxy-3,5-dimethyl-isochromen-1-one (Wang et al., 2012),

drechmerin C and F (Zhao et al., 2018), cyclo(Ala-Ile) (H.-H. Zhang et al., 2018) and cladosin A (Wu et al., 2014).

QS-inhibiting compounds were also putatively annotated, such as *cyclo*(Leu-Pro), *cyclo*(Phe-Pro), *cyclo*(Phe-Val), *cyclo*(Pro-Val), *cyclo*(Val-Leu) and *cyclo*(Pro-Tyr), in our study (Bofinger et al., 2017; Hatanaka et al., 2020; Kachhadia et al., 2022; Parasuraman et al., 2020a; Park et al., 2006; Sun et al., 2020). Indeed, cyclopeptides/diketopiperazines (12 detected) are frequently involved in QS mechanisms (Abbamondi et al., 2014; Bofinger et al., 2017; Buroni et al., 2018), as well as coumarins (8 compounds detected) (D’Almeida et al., 2017; Reen et al., 2018), beta-carboline (5) (Panthee et al., 2020) and butenolides (2) (Stewart et al., 2014; Vallet et al., 2020). Other compounds involved in QS were putatively annotated, such as 2-aminoacetophone (Chakraborty et al., 2020), riboflavin lumichrome (Rajamani et al., 2008), 2-heptylquinolin-4(1H)-one (HHQ) (Schütz and Empting, 2018) and a microperfuranone (Giddings and Newman, 2015; Yeh et al., 2012). Two algicides were also detected: *cyclo*(Leu-*trans*-4-hydroxy-Pro) and *N*-methyl-2-(2-methylpropoxy)aniline (An et al., 2015; Guo et al., 2015). Fungal compounds involved in chemical plant signaling were also identified such as the growth regulator pironetin (Dias et al., 2003), a compound involved in plant signaling, Gibberellin A12 (Davière and Achard, 2013) and a root growth inhibitor, Aspergimarín D (Huang et al., 2019).

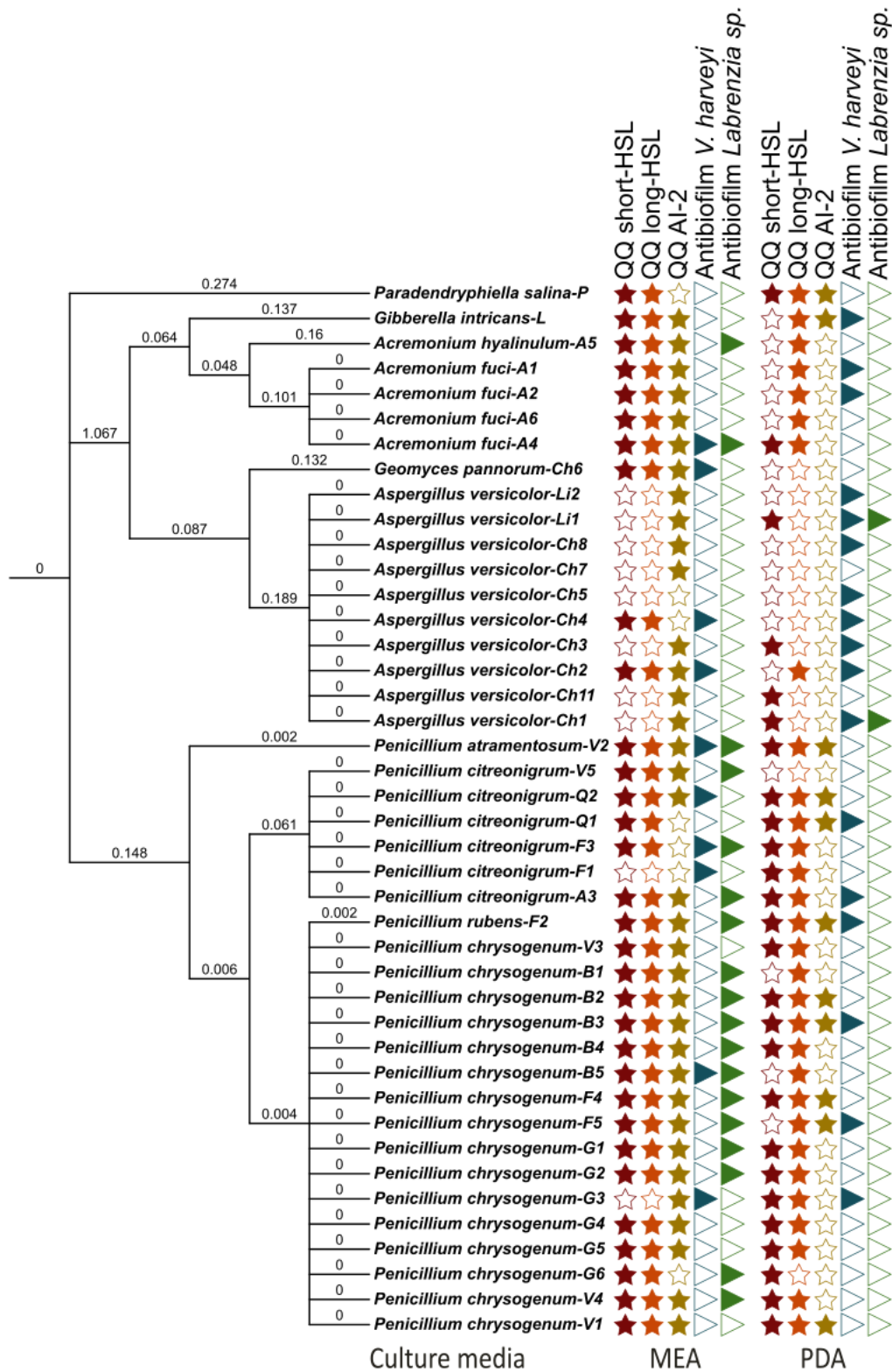




**Figure IV.2:** Metabolites putatively involved in microbial interactions produced by fungal strains isolated from the *S. latissima* epimicrobiota. Molecular subnetworks obtained after extraction of 100 metabolites potentially involved in interactions between microorganisms. The complete network containing 573 metabolites is shown in **Supp Figure IV.1** and annotations are shown in **Supp Tables IV.3A and 3B**.

## Production of QS chemical inhibitors by cultivable fungal strains of the algal epimicrobiota

Among the 42 fungal strains (**Figure IV.3** and **Supp Table IV.5** and **Supp Table IV.6**), 61 and 76% of fungal extracts were able to inhibit short- and long-chain HSL-based QS, respectively, in MEA and PDA culture media. AI-2-based QS was inhibited by 83% of fungal extracts in MEA culture medium and 26% in PDA. Among the extracts, *Acremonium* sp. strains stood out in the MEA culture medium by inhibiting all the signals involved in the QS tested. *Penicillium* sp. were also able to interact with QS compounds, with 80 and 92% of extracts inhibiting short- and long-chain HSL-based QS, respectively, and 84% inhibiting AI-2-based QS in MEA medium. In PDA medium, 84-92% of *Penicillium* sp. extracts were able to inhibit short- and long chain-HSL and 38% of AI-2-based QS. For *Aspergillus* sp. 20-70% inhibited long and short chain-HSL based QS and 80% inhibited AI-2-based QS in MEA, whereas in PDA, 10-40% inhibited long and short chain-HSL-based QS and 0% inhibited AI-2-based QS. *G. intricans* sp. strain inhibited all the compounds involved in QS tested (AHLs and AI-2) in MEA medium, while *P. salina* was able to inhibit them in PDA.

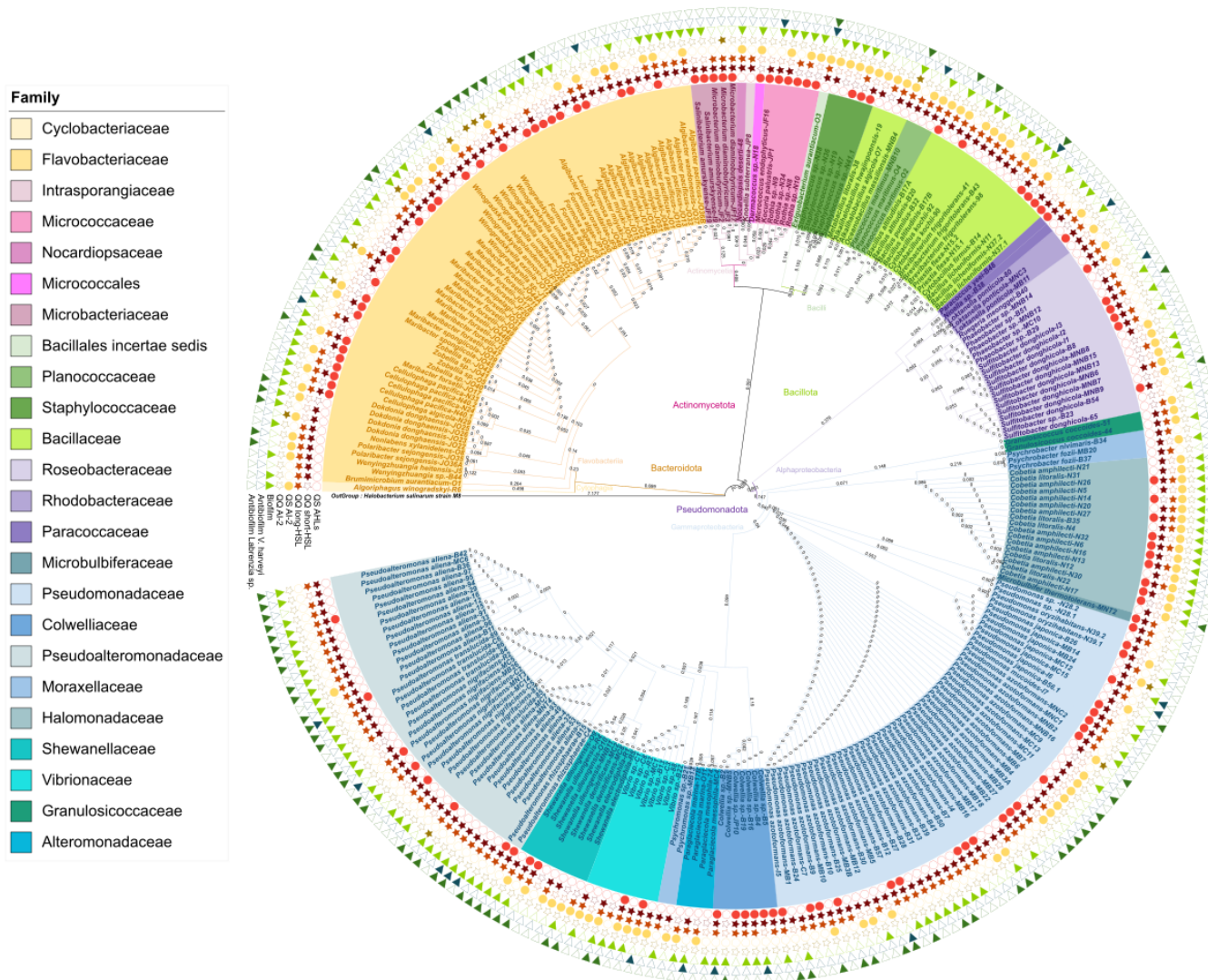


**Figure IV.3:** Bioactivities of fungal strains in MEA and PDB media. Phylogenetic tree of fungal strains and biotest results for each strain in MEA and PDA culture media. The numbers on the branches correspond to the genetic distance between strains.

## Chemical mediators involved in QS produced by cultivable bacterial epimicrobiota

The 272 bacterial strains isolated were screened for their ability to produce and inhibit QS mechanisms (short-HSL, long-HSL and AI-2-based QS) (**Figure IV.4** and **Supp. Table IV.7**). The results showed that 40% of the strains were able to produce AHL. Among the Micrococcaceae and Microbacteriaceae, 100% of the strains isolated were able to produce AHLs, as were 85% of the Colwelliaceae. Surprisingly, under our culture conditions, Moraxellaceae, Alteromonadaceae, Planococcaceae and Granulosicoccaceae were not able to produce AHLs. However, Granulosicoccaceae produced AI-2, as did Staphylococcaceae and Halomonadaceae. Overall, 44% of the strains in the collection produced AI-2 under our culture conditions.

Regarding QS inhibitors, 100% of strains of Granulosicoccaceae, Paracoccaceae and Planococcaceae were able to inhibit short and long-HSL-based QS. Of the 272 strains, 83.5% produced short-HSL-based QS inhibitors, compared with 65% for long-HSL-based QS. Among short-HSL based-QS-inhibiting strains, Moraxellaceae (100%), Microbacteriaceae (100%) and 98% of Pseudomonadaceae were particularly productive of this type of inhibitor, while for long-HSL inhibition Vibrionaceae were the most active (87%). Most strains in the Pseudoaltermonadaceae family produced both short and long-HSL-based QS inhibitors (98% and 87% respectively). Overall, for each bacterial genus, at least one strain is capable of inhibiting AHLs. However, only 3% of the strains isolated were able to inhibit AI-2-based QS, notably 20% of Microbacteriaceae and 12% of Flavobacteriaceae.



**Figure IV.4:** Bioactivities of bacterial strains in MB media. Phylogenetic tree of bacterial strains and biotest results for each strain in MB culture medium. The numbers on the branches correspond to the genetic distance between strains

### Ability to form and inhibit bacterial biofilm formation

Extracts of 42 fungal strains grown in 2 culture media (MEA 75% NSW and PDA 75% NSW) were also tested for their ability to inhibit bacterial biofilms (**Figure IV.3, Supp. Table IV.5, and Supp. Table IV.6**). *Vibrio harveyi* biofilm formation was inhibited in MEA by 20% of extracts produced by *Acremonium* sp. and *Aspergillus* sp. strains, and by 25% of those of *Penicillium* sp.. Such an antibiofilm effect was also shown for the extract of *Geomyces pannorum* cultivated in MEA and for *Gibberella intricans* cultured in PDA. In this culture medium, 80% of *Aspergillus* sp., 40% of *Acremonium* sp. and 25% of *Penicillium* sp. strains were able to inhibit biofilm formation. The biofilm of the *Labrenzia* sp. BBCC2184 strain was inhibited in MEA by 67% of the *Penicillium* metabolome and 40% of *Acremonium*' metabolome, but not by *Aspergillus* sp.. In PDA, only 20% of *Aspergillus* sp. were able to inhibit biofilm formation.

The biofilm-forming capacities of 272 bacterial strains were also tested and 59% were able to form biofilms under our culture conditions, notably 100% of Staphylococcaceae and Halomonadaceae, and 90% of Pseudoalteromonadaceae. Bacteria from the Microbacteriaceae and Colwelliaceae families were not able to form biofilms under our culture conditions (**Figure IV.4, Supp. Table IV.7**).

The biofilm growth inhibiting capacities of bacterial and fungal strains were also tested. Two biofilm inhibition tests were carried out, one on the biofilm-forming capacity of *Vibrio harveyi* and the second on *Labrenzia* sp. BBCC2184. Eight percent of bacterial supernatants were shown to inhibit *V. harveyi* biofilm without affecting its viability, notably 33% of Rhodobacteraceae and Planococcaceae strains, but also 28% of supernatants obtained from the Colwelliaceae family. Regarding *Labrenzia* sp. BBCC2184 inhibition, 38% of bacterial strains inhibited its biofilm formation, 72% of *Pseudoalteromonas*, and 62% of Shewanellaceae inhibited its biofilm formation. Among the Flavobacteriaceae family, the genus *Dokdonia* was shown capable of inhibiting this type of biofilm.

## Discussion

### Cultivable diversity of the epimicrobiota of *Saccharina latissima*

The surface epimicrobiota of macroalgae is a complex biofilm in which microbial interactions are also complex (Egan et al., 2013; Wahl et al., 2012). Few studies have been dedicated to the investigation of the epiphytic fungi associated with brown macroalgae, and the cultivable fungal diversity of the *S. latissima* epimicrobiota remains poorly explored. Our findings primarily noted the presence of epiphytic fungi belonging to the Dothideomycetes class (95%), with a predominant occurrence of *Penicillium* sp. (57%), *Aspergillus* sp. (24%) and a few *Acremonium* sp. (12%). In contrast, a previous study on endophytic fungi of *S. latissima* reported a predominance of Sordaryomycetes, and no endophytic strains previously reported are shared with our findings (Vallet et al., 2018). These results highlight a strong disparity between the fungal epimicrobiota and endomicrobiota suggesting a possible specificity of the fungal community according to the algal tissues colonized. Other studies have focused on the epiphytic fungi of brown macroalgae, with the authors isolating *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp. as well as *Geomyces* sp. and *Paradendryphiella salina* from *Fucus* sp. (Fan et al., 2019; Zuccaro et al., 2008). *Penicillium* sp. is a commonly occurring genus within the algal epimicrobiota, and its presence is therefore not surprising (Godinho et al., 2013).

Regarding the cultivable bacterial diversity within the *S. latissima* epimicrobiota, our study revealed the presence of 61% Pseudomonadota (51% Gammaproteobacteria and 8.8% Alphaproteobacteria), 24% Bacteroidota, 10% Bacillota and 5% Actinomycetota. Previous studies on *S. latissima* have identified similar strains, including *Pseudoalteromonas* sp., *Sulfitobacter* sp. *Granulosicoccus* sp., *Maribacter* sp. and *Psychrobacter* sp. in different proportions (Dong et al., 2012; Lu et al., 2023; Lytjou et al., 2021; Wiese et al., 2009b). Notably, Lu et al. (2023) highlighted the significant presence of Flavobacteriaceae and Rhodobacteraceae within the core microbiota of brown macroalgae, constituting 23% and 8% of the cultivable bacterial community in our study. Furthermore, Dong and collaborators showed the predominance of *Pseudomonas* sp. and *Psychromonas* sp. within *S. latissima* from the Arctic, whereas in our study, *Pseudomonas* sp. and *Pseudoalteromonas* sp. prevailed, with *Psychromonas* sp. being infrequently isolated (Dong et al., 2012). Besides the fact that culture-based and metabarcoding approaches could lead to diverse but complementary biodiversity

patterns. These variations in composition and proportions among different studies investigating the bacterial epimicrobiota of *S. latissima* can be attributed to variation in sampling locations associated with environmental factors (Arctic, Baltic Sea, China), as well as the algae's habitat (natural environment or cultivable) and the maturity of the alga (Davis et al., 2023). These observations may also reflect the capacity of macroalgae to modulate their surface epibionts according to biotic and abiotic parameters. The phenomenon of "gardening," widely known in the plant kingdom, may also be present in macroalgae, where they chemically recruit microorganisms that contribute to the enhancement of seaweed fitness (Saha and Weinberger, 2019).

### **Diversity of fungal chemical mediators**

Macroalgal extracts have been extensively studied for their production of various biologically active metabolites (Cunha and Grenha, 2016; Mena et al., 2020; Percival, 1979). However, exploration of the metabolites produced by macroalgal-associated fungi remains limited. As highlighted in a review by (Papagianni, 2004), each fungus exhibits unique metabolite production under distinct morphological and physiological conditions. Previous studies highlighted the production of secondary metabolites with antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities (Flewelling et al., 2013b, 2013a; Sarasan et al., 2017) as well as anticancer activity (Fan et al., 2019).

LC-MS/MS analysis of the epiphytic fungal metabolomes obtained from extraction of the cultivable fungi led to 573 metabolites. Only annotation of metabolites putatively involved in microbial interactions has been represented. Overall, more than 99 metabolites produced by the fungal microbiota of *S. latissima* might be involved in a molecular dialog. This encompasses antibacterial (18), antifungal (9), and antimicrobial compounds (26). Interestingly, some of the identified putative compounds are related to one species, whereas others seem to be common in different fungal strains, suggesting both specific and shared biological roles.

Among the different chemical mediators, QS molecules drew our interest. Indeed, QS is a key mechanism involved in microorganism communication and biofilm formation and maintenance (Fuqua et al., 1994; Neilson, 1977; Schulz, 2014). Our group has also previously demonstrated the key role of QS in the interspecies interactions between fungal and bacterial



endophytes associated with brown algae (Tourneroché et al., 2019). Herein, we demonstrated that fungal strains from the epimicrobiota produce various QS signals able to be activators such as the precursor 2-heptylquinolin-4(1H)-one (HHQ) (Schütz and Empting, 2018), or inhibitors such as cyclopeptides (5) (Lee et al., 2018; Li et al., 2023; Wang et al., 2022b; Yu et al., 2021). Moreover, in the coumarin family, 8 compounds were detected (**Supp. Table 4**), which features prominently in our investigation and are frequently associated with anti-QS and antibiofilm activities (“Coumarin,” 2018; Gutiérrez-Barranquero et al., 2015; Lee et al., 2014). Similarly, furanones and butenolides have been linked to anti-QS activities (De Nys et al., 1995; Phainuphong et al., 2017; Proctor et al., 2020). Although less studied, beta-carbolines have also demonstrated potential in this regard (Panthee et al., 2020). Consequently, many of the other annotated compounds in our study may possess QS or anti-QS activity, but they have never been tested for such activity (Luo et al., 2021). These results highlight the complex interactions that fungal strains can have with other microorganisms within the algal epimicrobiota.

### **Role of the epimicrobiota in regulating bacterial biofilms**

Fungal strains isolated from algal epimicrobiota have a strong potential to inhibit QS mechanisms, including AHLs and AI-2 based QS, with 95% of strains cultivated in MEA culture media possessing anti-QS activity. This anti-QS activity of marine fungi has already been demonstrated by a few authors in the marine environment (Chang et al., 2021; Dobretsov et al., 2011b; Naik et al., 2013; Parasuraman et al., 2020b; Saurav et al., 2017; M. Zhang et al., 2018; Zheng et al., 2013). These activities have also been observed in endophytic fungi associated with brown algae (Tourneroché et al., 2019; Vallet et al., 2018). However, to our knowledge, the presence of such activities in epiphytic fungal strains of macroalgae has not been documented. Notably, our research findings also highlight the presence of bacterial biofilm-inhibiting strains in the MEA culture media, accounting for approximately 57% of the total strains. This indicates that fungi possess significant potential in regulating bacterial biofouling. While the production of antifouling compounds by marine fungi has been the subject of several studies, with an overview provided by (Dobretsov et al., 2013), only a limited number of studies have focused on the ecological role of fungi in the epiphytic biofilm of macroalgae. Our findings suggest that epiphytic fungi may play a regulatory role in the

epimicrobiota of *S. latissima*, particularly in shaping bacterial communities acting on QS mechanisms.

In that context, we also explored the communication abilities of bacterial strains through QS mechanisms (AHLs and AI-2 based QS), as well as their biofilm formation capacity. These results revealed that 40% of bacterial strains were able to produce AHLs (short-, medium-, and long-chain HSL) and 44% of the strains communicated via AI-2. Additionally, 59% demonstrated biofilm-forming capabilities under our specific culture conditions. This substantial communication capacity suggests that QS may play a crucial role in maintaining the surface biofilm of brown macroalgae. Similarly, previous study indicated the involvement of QS in the protection of algae from biofouling through the action of QS inhibitors produced by epiphytic bacteria (Dahms and Dobretsov, 2017; Holmström et al., 2002; Ismail et al., 2016; Wiese et al., 2009b). Specifically, 87.5% of the bacterial strains inhibited short-chain HSL, and 65% inhibited long-chain HSL base QS. However, only 3% of the strains were capable of inhibiting AI-2 communication, and 8% exhibited biofilm formation inhibition. Moreover, the spectrum of QS compounds, which includes both activating and inhibiting agents sometimes produced by the same bacterial strains, shows remarkable diversity, with no exclusive association with a single bacterial genus. Therefore, the bacterial strains present in the *S. latissima* epimicrobiota exhibit the ability to influence the formation of algal biofilms. However, additional research is necessary to elucidate the precise mechanisms by which bacteria regulate the communities of epiphytic fungi. While Tournerocche et al., 2019 demonstrated the involvement of AI-2 in cross-kingdom signaling between bacteria and endophytic fungi in *Saccharina latissima*, it is plausible that other mechanisms may also contribute to these interactions.

### **Brown algae epimicrobiota, a source of new bioactive and antifouling compounds**

The microbiota of macroalgae is a source of new biologically active compounds such as antioxidant, antibacterial and anticancer agents (Apostolova et al., 2020; Gomes et al., 2022; Prasedya et al., 2022). Numerous studies have highlighted a wide range anti-QS compounds isolated from macroalgae, which could be used as innovative and low ecotoxic antifouling agents (Culioli et al., 2008; Dahms and Dobretsov, 2017; Othmani et al., 2016b; Saha and Wahl, 2013; Silkina et al., 2012; Viano et al., 2009). One of the most well-known

example is the halogenated furanones extracted from the red macroalga *D. pulchra*, although some other have since been identified (Borchardt et al., 2001; Chapman et al., 2014; De Nys et al., 1995; Dobretsov et al., 2011a). However, most of the bioactive anti-QS compounds previously identified, such as halogenated furanone, were also noted for their potential toxicity, reinforcing the need to pursue this exploration. Limited attention has been given to studying the anti-fouling properties of fungal strains of the brown algal epimicrobiota. Collectively, our findings establish that fungal strains originating from the epimicrobiota of brown macroalgae might represent a valuable source for anti-QS and antibiofilm compounds of interest. From our study, the epimicrobiota of brown algae, especially *Saccharina latissima*, represents a source of potential new compounds.

### **Limitations of the study**

Chemical databases to annotate LC-MS metabolomic profiles remain poorly documented especially for marine bacterial and fungal metabolites, limiting the identification of bioactive compounds in our study but this opens some very interesting perspectives for the discovery of novel antibiofilm compounds. The production of bioactive compounds by isolated strains might also be dependent on the selected media. We used two different media to overcome this limitation; however, we can expect the production of a wider diversity of pro-QS and anti-QS metabolites by each individual strain if multiplying culture conditions.

### **Acknowledgment**

We would like to greatly thank Arul Marie and Remy Puppo for acquiring MS/MS spectra on the mass spectrometry technical platform. We are grateful to the Bio2Mar platform (<http://bio2mar.obs-banyuls.fr>) part of EMBRC-France supported by the Investments of the Future program (ANR-10- INSB-02), for its technical assistance and support. We are grateful to Genoscreen, the company that sequenced the 16S rRNA of the bacterial strains (<https://www.genoscreen.fr/fr/>). This work was financially supported by the Institute of Environmental Transition of Sorbonne University (SU-ITE) to EA and the Thematic Action of the National Museum of Natural History (ATM).

### **Author contributions**

EA and BBD carried out the sampling. EA, CM, JM, and EW performed the experiments. EA and LI sequenced and identified fungal strains. EA, SP and RL performed the analysis. EA,

SP, RL, CL, and SR designed the project. EA, RL and SP wrote the manuscript. All authors had full access to all the data in the study and accepted responsibility for the decision to submit for publication.

### **Declaration of interests**

The authors declare no competing interests.



Chapitre V. Isolement de composés anti-QS  
et antibiofilm isolés de souches fongiques  
de l'épimicrobiote de *S. latissima*





# 1. Introduction générale du chapitre

## A. Contexte de l'étude

Les biofilms microbiens sont responsables de nombreux problèmes pour les activités maritimes militaires, industrielles et récréatives en mer (Champ, 2003; Gu et al., 2020; Schultz, 2007; Yebra et al., 2004). La plupart des composés antifouling actuellement utilisés sont des biocides hautement toxiques qui ont un impact significatif sur l'environnement naturel (Alzieu et al., 1986; Birchenough et al., 2002; Bryan et al., 1986; Thomas and Brooks, 2010; Waldock and Thain, 1983). Aucune alternative durable et respectueuse de l'environnement n'a encore été développée. Cependant, de tels composés chimiques existent dans la nature et de nombreuses espèces marines ont développé des stratégies pour se protéger des salissures biologiques (Dahms and Dobretsov, 2017). C'est notamment le cas des macroalgues qui sécrètent des molécules ciblant le quorum sensing (QS), un mode de communication intercellulaire impliqué dans la formation des biofilms (Fuqua et al., 1994; Nealson, 1977; Schulz, 2014). La recherche de composés à activité quorum quenching (QQ), interférant avec ce mécanisme clé, apparaît dans ce sens une stratégie pertinente pour identifier de nouvelles substances anti-salissures.

La connaissance de l'holobionte des macroalgues a révélé l'existence d'un microbiote associé capable d'influencer la structure et la fonction des communautés de microorganismes, ainsi que l'état de santé de l'algue hôte à travers l'émission de multiples composés bioactifs, impliqués en particulier dans des mécanismes de communication inter-cellulaires (Case et al., 2011; Egan et al., 2013, 2008). Plus précisément, il a été démontré que l'épimicrobiote de l'algue *Saccharina latissima*, est le siège de la production de signaux chimiques capables d'inhiber le QS bactérien et par extension d'inhiber la formation de biofilms. Dans ce contexte, dans nos travaux précédents, des souches fongiques présentes à la surface de *S. latissima* ont été isolées et cultivées puis étudiées pour leurs propriétés anti-QS et antibiofilms. L'objectif de cette étude est de rechercher de nouveaux composés anti-QS et antibiofilm, de les isoler et caractériser afin de révéler de nouveaux antifouling éco-compatibles.



## B. Sélection des souches

Au cours de nos travaux précédents (**Chapitre IV**), trois souches fongiques se sont montrées particulièrement prometteuses pour atteindre notre objectif : *Penicillium chrysogenum* B5, *Penicillium atramentosum* V2 et *Acremonium fuci* A4. Ces trois souches ont été capables d'inhiber le signal des N-acyl-homoserine lactone (AHLs) et des diester de borate furanosylé (AI-2) qui sont tous deux des composés clés impliqués dans les mécanismes de QS. Les souches fongiques se sont également montrées capables d'inhiber la formation de biofilm de deux souches rapportrices. Il est intéressant de noter que l'activité anti-QS de *P. atramentosum* avait déjà été mise en évidence par Wang et al., 2011, mais qu'aucun des composés impliqués dans cette activité n'a pu être isolé et caractérisé (Wang et al., 2011). *P. atramentosum* fait l'objet de peu d'études, peut-être de par son occurrence rare dans les environnements marins, comme en témoigne la seule étude qui rapporte sa présence au sein de l'holobionte de la phanérogame *Zostera marina* en mer Baltique (Petersen et al., 2019). Jusqu'à présent, seuls quelques composés ont été identifiés et caractérisés chez des *P. atramentosum* non marins, tels que les atpénines A4 (inhibiteur de mitochondrie), l'acide secalonic D (antitumoral) et des mycotoxines (non caractérisées) (Frisvad and Filtenborg, 1983; Larsen et al., 2002; Ogórek et al., 2022). Le métabolome de cette espèce n'a été que très peu étudié contrairement à celui de *Penicillium chrysogenum*, qui fait l'objet de nombreuses études dans ce domaine, bénéficiant d'une description méticuleuse (Alvarez et al., 1993; Chang et al., 2021, 2019a; de Jonge et al., 2012; Yu et al., 2021). Les souches d'*Acremonium* sp. sont régulièrement isolés d'holobiontes marins et représentent une source prometteuse de composés naturels novateurs. Par exemple, une souche d'*Acremonium* sp. a été prélevée de l'algue brune *Cladostephus spongus*, produisant des dérivés de l'hydroquinone aux propriétés antioxydantes (Abdel-Lateff et al., 2002). *Acremonium strictum*, isolé d'une éponge marine *Choristida* sp., s'est révélée producteur de l'acremostrictin, un composé avec une activité antibactérienne et antioxydante (Juliанти et al., 2011). Une souche d'*Acremonium* sp. provenant d'un tunicier des Caraïbes s'est montré capable de produire de l'oxépine et des fumiquinazolines démontrant des propriétés anti-inflammatoires et antifongiques (Luo et al., 2019). Des souches d'*Acremonium fuci* ont régulièrement été isolées au sein d'holobiontes marins, en particulier chez les macroalgues (rouges et brunes) mais leur métabolome n'a été pour le moment que très peu exploré (Hong et al., 2015; Kovalenko et al., 2023; Lee et al.,

2019; Zuccaro et al., 2008). Ainsi, il apparaît que *Penicillium atramentosum* V2 et *Acremonium fuci* A4 présentaient un potentiel prometteur en tant que sources de nouveaux composés bioactifs dotés d'activités antifoulings. Cependant, compte tenu du faible rendement d'*Acremonium fuci* A4 lors des cultures en grand volume, le travail n'a pas été poursuivi sur cette souche. Nous présentons ici les résultats liés au travail mené sur *Penicillium atramentosum* V2

## 2. Matériels et méthodes

### Culture en grand volume de *P. atramentosum* V2

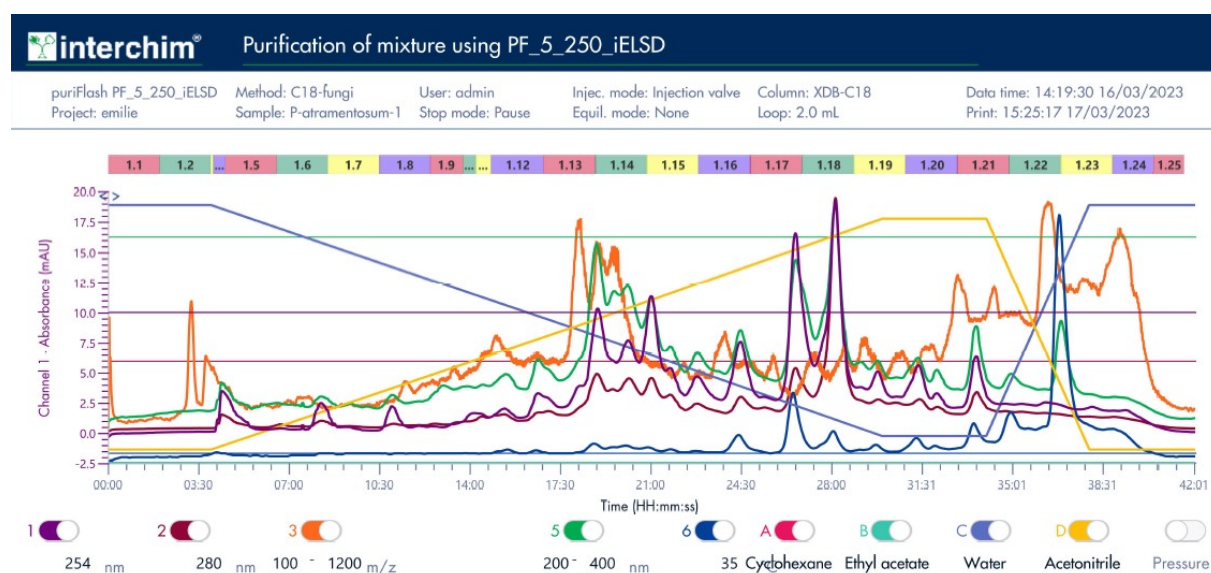
À partir de cultures solides de *P. atramentosum* V2 en milieu MEA 75% NSW, 12 erlenmeyers de 500 ml contenant 250 ml de MEA 75% NSW ont étéensemencés avec des morceaux de géloses (3 morceaux de 1 cm<sup>2</sup> par erlenmeyer). Les cultures ont été incubées sous agitation pendant 7 jours à 18°C dans l'obscurité (**Figure V.1**). Les cultures ont ensuite été filtrées sur 4 µm puis 0.2 µm avec une pompe à vide, et les filters ont été extraits à l'acétate d'éthyle avec 15 min dans un bain à ultrasons, suivi de 12h d'agitation puis à nouveau de 15 min d'ultrasons. La phase organique a été évaporée à sec et l'extraction a été ensuite effectuée une seconde fois. En parallèle, le surnageant a été extrait par l'acétate d'éthyle (70% EtOAc/30% culture liquide) dans une ampoule à décanter après 24h d'agitation. La phase organique à l'issue des deux extractions a été évaporée sous pression réduite pour donner un extrait brut solide de 720,24g. En parallèle, une extraction du milieu MEA seul a été réalisée dans les mêmes conditions, afin de soustraire les composés, présents dans le milieu de culture, des résultats de l'extrait d'intérêt.



**Figure V.1:** Culture de 3L de *Penicillium atramentosum* V2 en milieu liquide MEA/NSW

## A. Isolement de composés Isolement et purification des composés par HPLC préparative

L'extrait brut (720,24 mg) a été purifiée par HPLC préparative (10 mL/min, A : eau + 0,1 % d'acide formique, B : acétonitrile + 0,08 % d'acide formique, isocratique 5 % pendant 4 min, gradient : 5 à 90 % pendant 24 min, isocratique 90 % pendant 4 min et gradient 90 à 5 % pendant 4 min), ce qui a permis d'obtenir 11 fractions (nommées F1 à F11, **Figure V.2** et **Tableau V.1**). Les expériences d' HPLC préparative ont été réalisées sur Puriflash® (Interchim), sur colonne Agilent PrepHT XDB-C18 (21,2 × 150 mm i.d. ; 5 µm ; USA). L'appareil est composé d'un détecteur UV à 254 et 280 nm ainsi que d'un détecteur DEDL (détecteur évaporatif à diffusion de la lumière) à 35°C.



**Figure V.2:** Interface de la puriflash® lors de l'élaboration des différentes fractions. Uniquement les voies C (water) et D (acétonitrile) ont été utilisées lors de l'élaboration du gradient de solvant permettant l'élution de l'extrait

Fraction	Tube	Masse (mg)
1	1.1-1.4	15.4
2	1.5	1.2
3	1.6-1.7	< 1
4	1.8-1.9	8
5	1.10-1.12	18
6	1.13	3.7
7	1.14-1.15	20.9
9	1.16	18.5
10	1.17	17.7
11	1.18	16.5
12	1.19	10.3

**Tableau V.1:** Poids des fractions après purification en phase inverse

L'activité biologique des fractions 7 et 10 couplée à la présence de nombreux signaux sur les spectres de MS et de RMN ont motivé le choix d'étudier ces fractions. La fraction 7 (20,9 mg) et la fraction 10 (17,7mg) ont été purifiées par HPLC préparative (10 mL/min), solvant A : eau + 0,1% d'acide formique, solvant B : acétonitrile + 0,08% d'acide formique, isocratique 5% de solvant B pendant 4 min, gradient : 5 à 90% pendant 24 min, isocratique 90% pendant 4 min et gradient 90 à 5% pendant 4 min) donnant 7 fractions chacune. Les sous-fractions sont nommées F7-1 à F7-7 et F10-1 à F10-7 (**Tableau V.2 et Tableau V.3**).

Fraction F7	Tube	Masse (mg)
1	7.8	1
2	7.10-7.11	1,6
3	7.12	1
4	7.13-7.14	2
5	7.16-7.17	5,4
6	7.18-7.19	3,4
7	7.32-7.34	2,3

**Tableau V.2:** Poids des fractions après purification de la fraction 7

Fraction F10	Tube	Masse (mg)
1	10.19	< 1
2	10.20	8,1
3	10.21	< 1
4	10.22	< 1
5	10.31	< 1
6	10.32	< 1
7	10.33	< 1

**Tableau V.3:** Poids des fractions après purification de la fraction 10

## B. Analyses métabolomiques par LC-MS/MS

L'extrait sec et les fractions de *P. atramentosum* ont été solubilisés dans du méthanol à une concentration de 10 mg.mL<sup>-1</sup> et injectés en HPLC-MS/MS (2µL). La séparation a été réalisée à l'aide d'une colonne C18 Acclaim™ RSLC PolarAdvantage II (2,1 × 100 mm, 2,2 µm de taille de pore; Thermo Fisher Scientific, États-Unis) connectée à un système HPLC Dionex Ultimate 3000. La colonne a été couplée à un spectromètre de masse Maxis IITM QTOF (Bruker, États-Unis) équipé d'une source d'ionisation par électrospray. Le débit a été fixé à 300 µL.min<sup>-1</sup>. Les paramètres de la MS étaient les suivants : tension d'électrospray de 3,5 kV, pression du gaz de nébulisation (N<sub>2</sub>) de 35 psi, débit du gaz de séchage (N<sub>2</sub>) de 8 L.min<sup>-1</sup> et température de séchage de 200°C. Les phases mobiles étaient l'eau (0,1 % d'acide formique) et l'acétonitrile (0,1 % d'acide formique, solvant B) suivant un gradient de solvant B à 5, 50, 90 et 5 % pendant 0, 9, 15 et 21 minutes, respectivement.

Les données de LC-MS/MS ont été analysées à l'aide de DataAnalysis (version 4.4, Bruker Daltonik GmbH) et converties en ".mzXML". Les données de LC-MS/MS ont été prétraitées sur MzMine 3.2.8 (Pluskal et al., 2010; Schmid et al., 2023) avec un niveau de bruit de fond de 1E3 pour MS1 et 1E2 pour MS2, et le « ADAP chromatogramme » a été construit avec un « minimum group size of scan » de 2 ; un « group intensity threshold » et un « minimum highest intensity » de 3E3 (Myers et al., 2017). Les chromatogrammes ont été résolus avec « ADAP Module Disclaimer » avec un seuil S/N à 10, « minimum feature height » de 1, un seuil de coefficient/area à 10, 0,02-1,00 pour la durée de pic et 0,10-0,50 pour le « RT wavelet range ». Les spectres ont ensuite été désisotopés et filtrés pour ne conserver que les pics avec des scans MS2 et un alignement de RANSAC a été effectué. Après l'alignement, les

composés présents dans les milieux de culture (MEA) ont été soustraits de la matrice à l'aide de l'outil de soustraction du blanc. Cette étape permet d'éliminer de l'ensemble des données les composés présents dans les milieux de culture. Les données ont ensuite été exportées sur FBMN-GNPS pour construire un réseau moléculaire avec un cosinus de 0,6 et 4 ions fragments appariés au minimum, une tolérance de masse de l'ion précurseur (PIMT) et une tolérance de masse de l'ion fragment (FIMT) à 0,05 Da (Nothias et al., 2020 ; M. Wang et al., 2016). Les métabolites ont été annotés avec différents outils du GNPS, notamment Library Search, Dereplicator, Dereplicator + (Mohimani et al., 2018), ainsi que Sirius 5.6.3 (Dührkop et al., 2019) en utilisant les outils Molecular formula identification, ZODIAC, CSI:FingerID, CANOPUS (Djombou Feunang et al., 2016; Dührkop et al., 2021, 2015; Hoffmann et al., 2021; Kim et al., 2021; Ludwig et al., 2020). En outre, les valeurs  $m/z$  et les formules de masse ont été recherchées et annotées à l'aide des bases de données de produits naturels NPAtlas, MarinLit et LOTUS (Rutz et al., 2022 ; van Santen et al., 2019 ; van Santen et al., 2022). Les annotations ont été ajoutées au réseau à l'aide du logiciel Cytoscape 3.10.0 (Shannon et al., 2003).

### **C. Caractérisation des composés actifs par RMN**

Les spectres RMN ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker Avance III HD à 400 MHz et 600 MHz (Wissembourg, France) équipés respectivement d'une sonde BBFO Plus Smart et d'une cryosonde TCI triple résonance (CNRS-MNHN). Les déplacements chimiques des solvant utilisés sont (MeOH- $d_4$  :  $\delta_H$  3,31 ;  $\delta_C$  49,15 ;  $CDCl_3$  :  $\delta_H$  7,26 ;  $\delta_C$  77,16). L'analyse des spectres de RMN a été effectuée par Adrien Delorme, stagiaire de Master 1 en Sciences du médicament à l'Université de Saclay, associé au projet, et encadré par Soizic Prado et moi-même.

### **D. Détection des activités anti-QS**

#### **Détection de l'inhibition des circuits du QS basés sur l'émission d'AHLs**

Pour détecter l'inhibition des circuits du QS basés sur l'émission d'AHLs, le biosenseur *Chromobacterium violaceum* CV026 a été cultivé en milieu liquide (McClellan et al., 1997). Brièvement, le biosenseur CV026 a été pré-cultivé dans le milieu Luria Bertani (LB) supplémenté avec 3  $\mu$ M de C6-HSL (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) pour CV026. La préculture a été incubée à 25°C, pendant 24 heures. En microplaque, 180  $\mu$ L de biosenseur

supplémenté en C6-HSL à 3  $\mu\text{M}$  (dilués à 1/50 dans le milieu de croissance) ont été ajoutés, suivis de 20  $\mu\text{L}$  d'extrait fongique à 1 mg/ml (dissous dans 10% de DMSO). Après 24 heures, la croissance cellulaire ( $\text{DO}_{630\text{nm}}$ ) a été mesurée à l'aide d'un spectrofluoromètre Victor 3 (Pelkin Elmer). La production de violacéine a été directement observée après 24 heures mais la  $\text{DO}_{540\text{nm}}$  a également été mesurée. L'inhibition du signal du biosenseur a été calculée pour déterminer le pourcentage d'inhibition des AHLs. Deux contrôles négatifs ont été utilisés pour les tests : (i) les biosenseurs sans ajout d'AHLs, avec un extrait de milieu de culture des souches fongiques dilués dans le 10% de DMSO (ii) les biosenseurs avec AHLs et ajout d'extrait de milieu de culture dilué dans 10% de DMSO (20 $\mu\text{L}$ ). Le témoin positif est le surnageant de la souche BBCC116 (anciennement MOLA116), connu pour inhiber les AHLs (Blanchet et al., 2017).

### **Détection de l'inhibition des circuits du QS basés sur l'émission d'AI-2**

Pour la détection de l'inhibition des circuits du QS basés sur l'émission d'AI-2, le biosenseur *Vibrio harveyi* MM32 ( $\text{luxN}::\text{Cm}$ ,  $\text{luxS}::\text{Tn5Kan}$ ) a été utilisé en présence de 1  $\mu\text{M}$  de DPD (précurseur d'AI-2, provenant du groupe de recherche de Rita Ventura à l'ITQB, Oeiras, Portugal)(Ascenso et al., 2011). La souche rapportrice *V. harveyi* MM32 a été cultivée à 30°C dans un milieu Marine Broth avec DPD, avec de la kanamycine (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et du chloramphénicol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Bassler et al., 1993; Freeman and Bassler, 1999; Tourneroché et al., 2019).

Dans une microplaque, à 180  $\mu\text{L}$  de biosenseur (dilué au 1/100 dans le milieu de croissance) ont été cultivés en présence de DPD (1 $\mu\text{M}$ ), et 20 $\mu\text{L}$  d'extrait ou de fractions fongiques ont été ajoutés. Les contrôles négatifs réalisés ont été (i) le biosenseur sans ajout de DPD, avec 20  $\mu\text{L}$  d'extrait de milieu de culture des souches fongiques solubilisé dans 10% de DMSO (ii) le biosenseur en présence de DPD, avec 20  $\mu\text{L}$  d'extrait de milieu de culture solubilisé dans 10% de DMSO (20 $\mu\text{L}$ ). Le contrôle positif utilisé était l'extrait actif de la souche fongique *Microsphaeropsis olivacea* AN329T dissoute dans du DMSO 10% (20 $\mu\text{L}$ ) mis en évidence dans (Tourneroché et al., 2019). Après 24 heures à 30°C, la croissance cellulaire ( $\text{DO}_{630\text{nm}}$ ) et la luminescence ( $\text{DO}_{540\text{nm}}$ ) de MM32 ont été mesurées à l'aide d'un spectrofluorimètre Victor 3 (Pelkin Elmer®).

## E. Détection des activités antibiofilm

Pour évaluer la capacité des souches microbiennes à inhiber la formation de biofilms, deux souches de référence ont été utilisées : *Vibrio harveyi* F5-F11 et *Labrenzia* sp. BBCC2184, qui proviennent des collections de notre laboratoire. Ces souches ont été cultivées dans des microplaques 48 puits (950 µL) à 25°C dans du MB pendant 48h, en présence de 50 µl d'extrait ou de fractions à 1 mg/ml dans du DMSO (10%) pour limiter la toxicité potentielle des souches fongiques. Deux contrôles ont été effectués, (i) la souche seule (ii) la souche avec 50µl d'extrait de milieu de culture dilué dans du DMSO (10%).

Après avoir mesuré la  $DO_{630nm}$  avec un spectrofluorimètre Victor 3 (Perkin Elmer®), les microplaques ont été rincées avec du PBS, séchées, puis traitées avec du cristal violet (0,2% Sigma, dilué dans 20% d'éthanol) pendant 15 min dans l'obscurité et à température ambiante. Ensuite, les microplaques ont été rincées à l'eau (trois fois) et les puits ont été décolorés avec une solution décolorante (33% d'acide acétique glacial) pour révéler la présence du biofilm. La  $DO_{540nm}$  a été mesurée au spectrofluorimètre.

## F. Traitements des résultats, analyses statistiques et représentations graphiques

Pour l'inhibition du quorum sensing (AHLs et AI-2) et l'inhibition de la formation de biofilm, les calculs effectués sont les mêmes que dans le **Chapitre IV** avec pour contrôle négatif l'extrait de milieu de culture solubilisé dans le DMSO 10%. Les résultats des biotests ont été traités séparément et les tests statistiques (tests de Mann-Whitney) ont été réalisés à l'aide de GraphPad Prism 8. Les résultats ont ensuite été transformés en un ensemble de données binaires basées sur la significativité.



### 3. Résultats

#### A. Métabolome de *Penicillium atramentosum* V2 isolée de l'algue brune *Saccharina latissima*

Le métabolome de *Penicillium atramentosum* V2 isolée du microbiote de surface de *Saccharina latissima* a été analysé par LC-MS/MS (**Figure V.3**). Après traitement des données, 123 métabolites ont été obtenus en MS/MS et sont représentés sous la forme d'un réseau moléculaire (FBMN) (**Figure V.4**). Ce réseau comprend 102 métabolites dont la masse et la famille moléculaire ont été déterminées, et 69 composés putativement annotés (**Tableau Supp. V.1**). Le métabolome comprend 38 acides aminés, 19 stéroïdes et dérivés de stéroïdes, 10 composés carbonylés, 8 acyles gras, 6 benzopyranes, 4 benzènes et dérivés de benzènes, 3 pyridines et dérivés, 2 flavonoïdes et 2 imidazopyrimidines et d'autres familles représentées par un unique métabolite. Parmi les acides aminés de nombreux peptides cycliques (23 composés) sont présents (**Figure V.5**, Cluster B) tels que *cyclo*(Leu-Ile), *cyclo*(Leu-Pro), *cyclo*(Tyr-Leu), tilivalline ou encore *cyclo*(Phe-Ala). Le cluster A est composé de nombreuses andrastines putatives avec notamment l'andrastin A-D et l'andrastin F mais aussi des atpenines A4 et A5 putatives. Le cluster C est composé de la penifurane C et de l'anserinone B mais également de la benzopyran 2,3-dihydro-5-hydroxy-2-méthyl-4H-1-benzopyran-4-one, de l'indole 1-hydroxyméthylindole-3-carboxylique acid et du composé carbonylé 1-(2,5-dihydroxyphényl)-3-hydroxybutan-1-one. La roquefortine C et son précurseur la tryhistatin mais aussi la roquefortine M ont été détectés. D'autres composés typiques des *Penicilliums* ont été mis en évidence comme l'atpenine B et un dérivé connu d'atpenine (sans nom dans les bases de données), l'acide sécalonique D mais aussi la glandicoline, la méléagrine, l'oxaline.

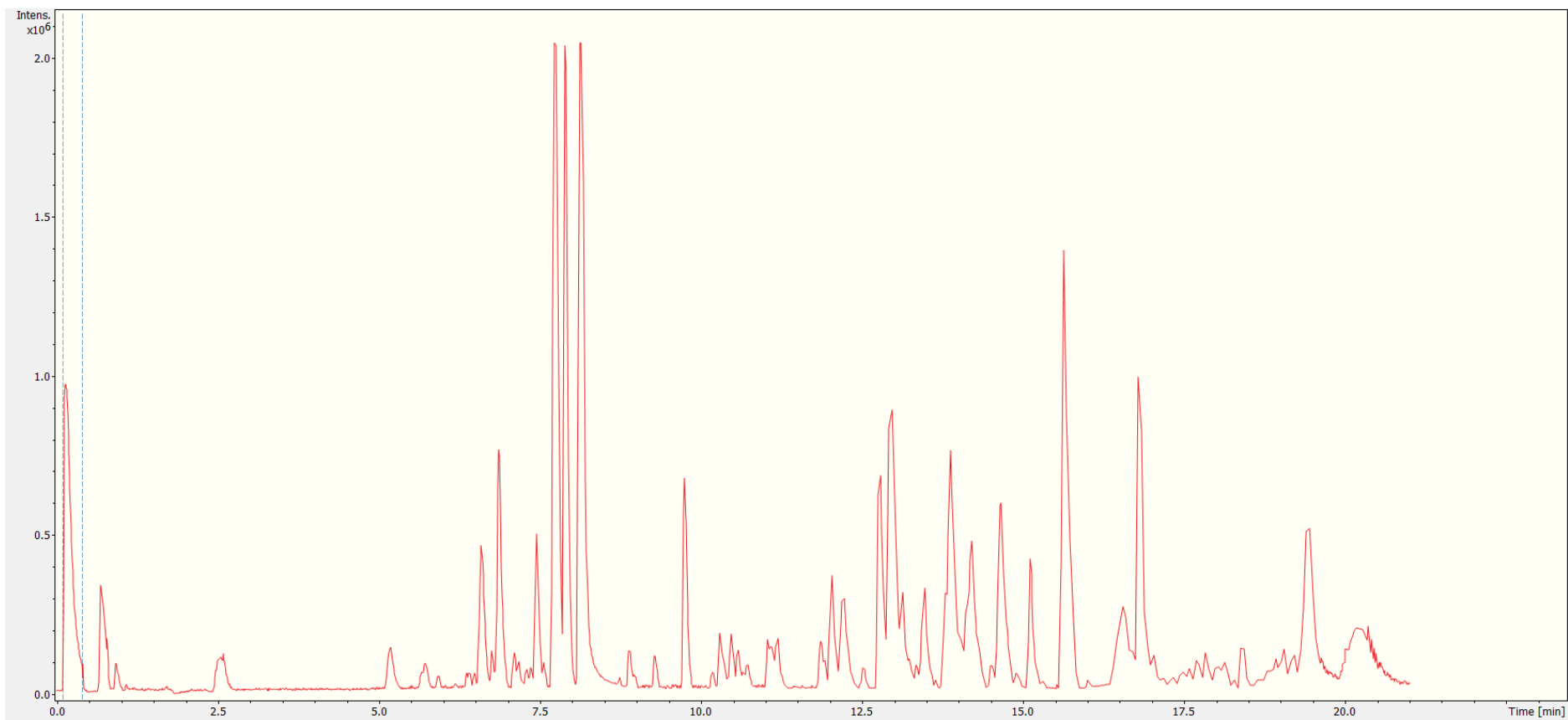
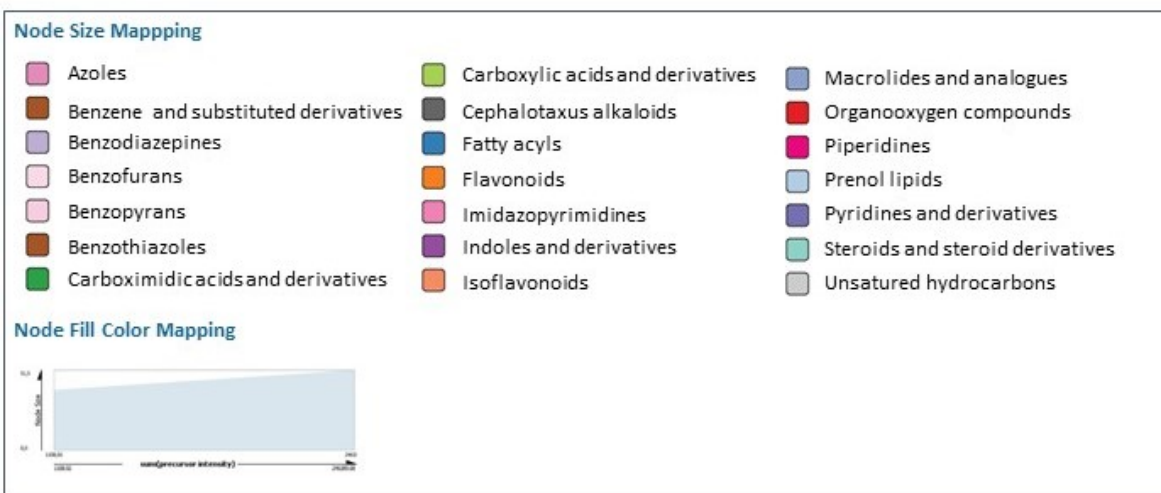
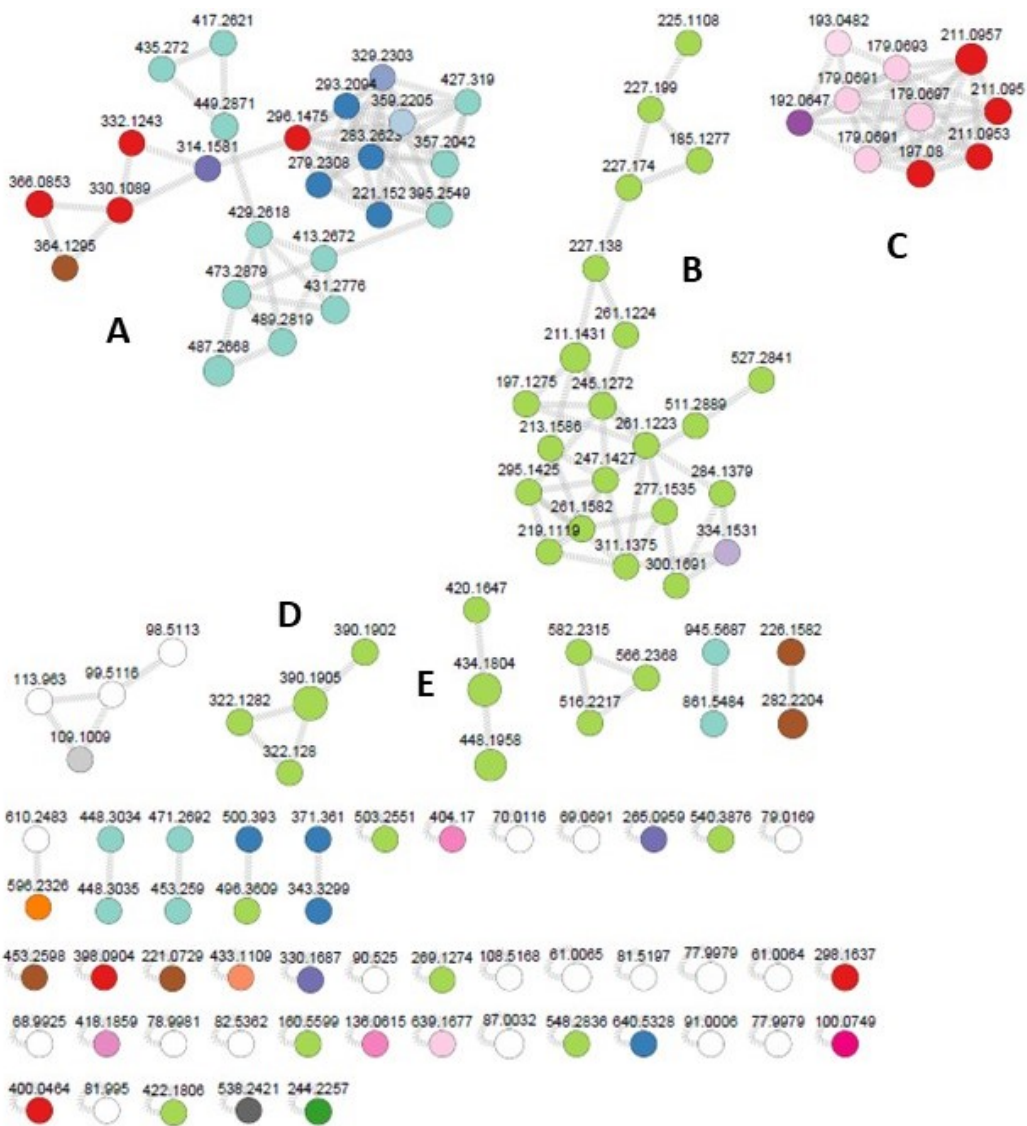


Figure V.3 : Spectre de LC-MS/MS de *Penicillium atramentosum* V2



**Figure V.4:** Réseau moléculaire (FBMN) du métabolome de *Penicillium atramentosum* V2 avec les classes moléculaires putatives des métabolites présents

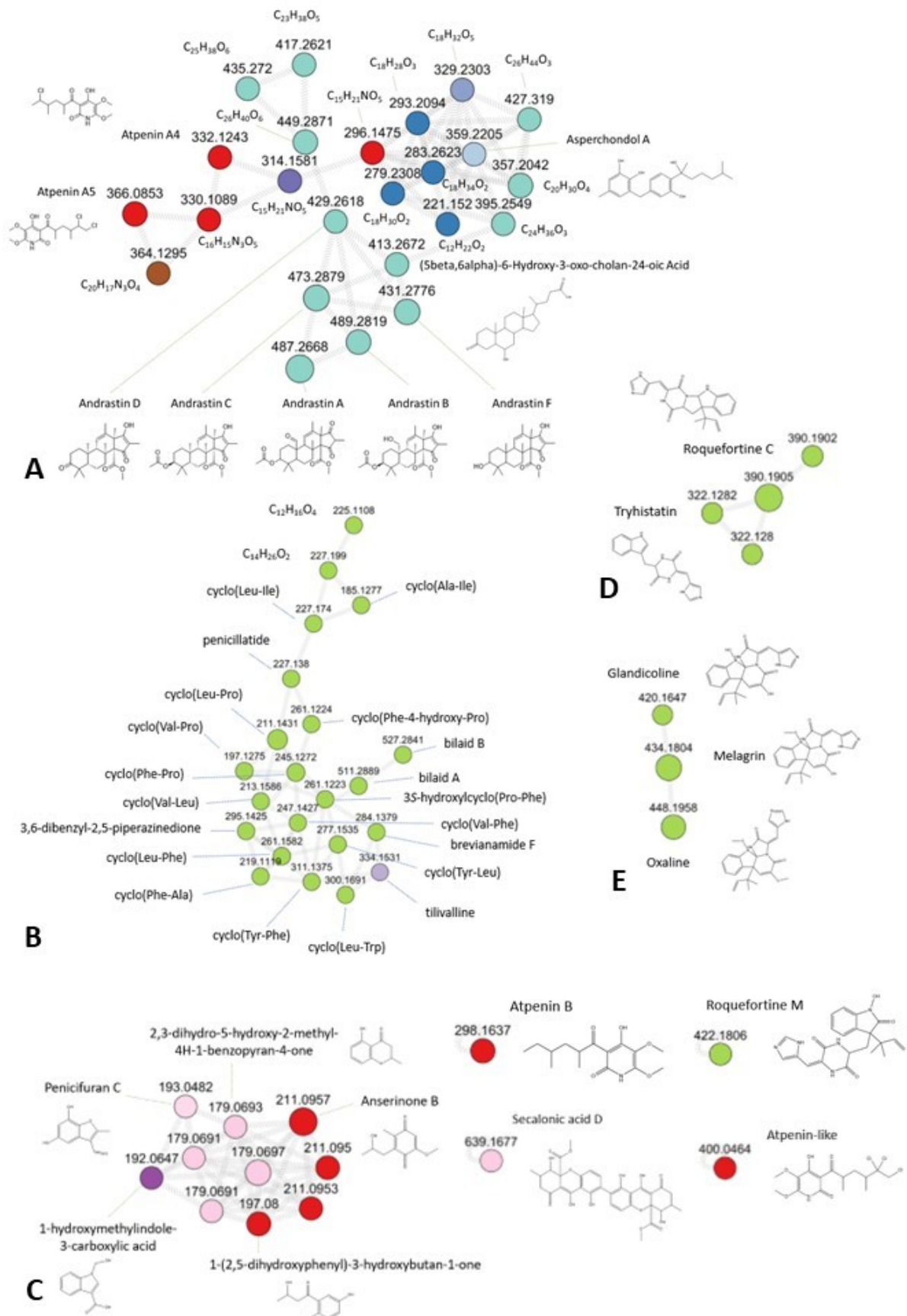


Figure V.5: Annotations putatives des métabolites de *Penicillium atramentosum* V2

## B. Fractionnement et bioguidage

Toutes les fractions ont été analysées par LC-MS/MS et les annotations ont été reportées sur les spectres de chaque fraction. Le fractionnement par Puriflash® a été guidé par l'ELSD et a permis de déterminer les composés majoritaires des fractions. Il s'agit des *cyclo*(Phe-Pro), de l'azinanone (piperin-4-one) et de l'oxaline dans la fraction 2 ; la méléagrine, le *cyclo*(Val-Pro) et le *cyclo*(Leu-Phe) dans la fraction 3 ; un ensemble de cyclopeptides dont *cyclo*(Val-Pro), *cyclo*(Phe-trans-4-hydroxy-Pro), *cyclo*(Leu-Pro) et *cyclo*(Phe-Pro) dans la fraction 4 ; tilivaline, roquefortine M et glandicoline B dans la fraction 5. La fraction 6 était composée majoritairement d'oxaline et de méléagrine ; la fraction 7 d'andrastine A,B,C,F, d'atpenine A5 et d'acide secalonic D. La fraction 9 était composée d'atpenines et d'andrastine C et F. Les autres composés présents sont l'acide palmitique, l'andrastine C et d'acide 6beta-Hydroxy-3-oxo-5beta-cholan-24-oic dans la fraction 10 ; l'anserinone B dans la fraction 11 et le bis(4-(tert-butyl)phenyl)amine dans la fraction 12. La roquefortine C était présente dans les fractions 3 à 11.

Par la suite, dans le but de déterminer quelles fractions contenaient les composés actifs, les capacités à inhiber les mécanismes du QS et la formation de biofilm ont été testées sur toutes les fractions puis sous-fractions (**Tableau V.4**). Les résultats mettent en évidence qu'aucune fraction n'était capable d'inhiber toutes les activités simultanément suggérant alors que l'extrait ne contient donc pas de composés génériques permettant l'inhibition de tous les mécanismes. Cependant certaines fractions étaient particulièrement actives comme notamment la fraction F7 et les sous-fractions F7.2, F7.4, F7.5 et F7.6 mais aussi la fraction F9 avec une activité anti-QS et antibiofilm. La fraction F4 a été capable d'inhiber la formation de biofilm de *Vibrio harveyi* F5-F11 et les fractions F3, F6, F7, (sous-fraction F7.1 et F7.3) et F10 (sous-fraction F10.1, F10.2 et F10.6) les mécanismes de QS reposant sur la production d'AHLs. La fraction F12 a été capable d'inhiber la formation de biofilm de *Vibrio harveyi* F5-F11 et *Labrenzia* sp. BBCC2184.

Fraction	Antibiofilm <i>Vibrio harveyi</i>	Antibiofilm <i>Labrenzia sp.</i>	QQ AI-2	QQ AHLs
Extrait	+	+	+	+
F1	-	-	-	-
F2	-	-	-	-
F3	-	-	-	+
F4	+	-	-	-
F5	-	-	-	-
F6	-	-	-	+
F7	-	+	+	+
F7.1	-	-	-	+
F7.2	-	-	+	+
F7.3	-	-	-	+
F7.4	-	+	-	+
F7.5	-	+	-	+
F7.6	-	+	-	+
F7.7	-	-	-	-
F9	-	+	-	+
F10	-	-	-	+
F10.1	-	-	-	+
F10.2	-	-	-	+
F10.3	-	-	-	-
F10.4	-	-	-	-
F10.5	-	-	-	-
F10.6	-	-	-	+
F10.7	-	-	-	-
F11	+	+	-	-
F12	+	-	-	-

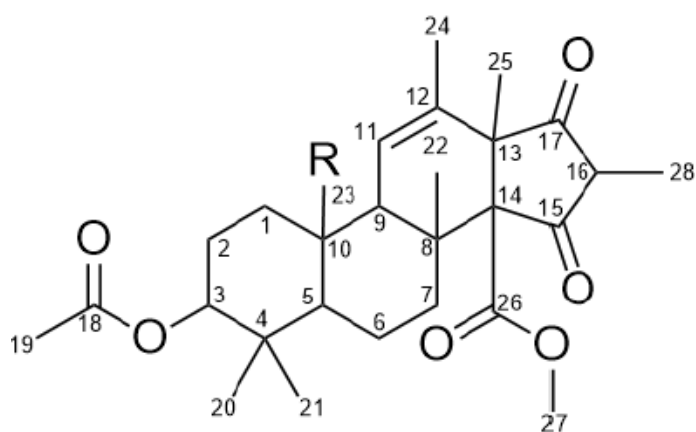
**Tableau V.4 :** Activités d'inhibition de la formation de biofilm et des mécanismes du QS de de l'extrait et des fractions à 100 µg/ml. « + » pour significativement bioactif » et « - » non significatif.

### C. Caractérisation des composés et fractions actives

Peu de fractions se sont révélées n'être composées que d'un seul métabolite et la quantité de ces derniers dans chaque fraction était minime dans la plupart des cas. Cependant, les sous-fractions F7-2 (2mg), F7-5 (5,4 mg), F7-6 (3,4 mg) et F10-2 (8,1 mg) présentaient assez de matières pour des analyses RMN et pour évaluer leur bioactivité.

La RMN du proton de la fraction 7-5 (**Supp. Figure V.1**) a révélé des signaux caractéristiques de l'andrastine A. En effet, on observe un signal très déblindé à  $\delta_H$  10 ppm caractéristique d'un aldéhyde. Par ailleurs, on note la présence d'un proton éthylénique sous forme de singulet à  $\delta_H$  5.28 ppm et d'un proton oxyméthine à  $\delta_H$  4.52 ppm, sous forme de

triplet avec une constante de couplage  $J = 2.4$  Hz, correspondant aux protons H-11 et H-3 respectivement. Ces deux signaux sont des signaux caractéristiques des andrastines. La présence de 7 méthyles à  $\delta_H$  3.61, 2.13, 1.68, 1.62, 1.27, 1.24, 1.19, 0.96, 0.90 ppm dont un particulièrement déblindé correspondant au méthyle de la fonction ester permet de mettre en évidence tous les méthyles de la molécule et de confirmer la structure de type andrastine A (**Figure V.5**). Deux autres composés de la même série sont retrouvés en mélange dans les fractions F7.4 et F10.2. Le spectre de RMN  $^1H$  montre clairement l'absence de proton d'aldéhyde pour la molécule de la fraction F7-4 au profit de la présence d'un méthylène inéquivalent à  $\delta_H$  3.67 et 3.33 permettant de confirmer la présence de l'andrastine B (**Supp. Figure V.2**). Le troisième composé présente un méthyl singulet supplémentaire à  $\delta_H$  0.83 et l'absence d'aldéhyde suggérant alors que le composé de la fraction F10-2 est l'andrastine C (**Supp. Figure V.3**). La fraction F7-6 (3,6 mg) correspond à un composé actif contre la formation de biofilm *Labrenzia* sp. BBCC2184 La RMN du proton (**Supp. Figure V.4**) de cette fraction révèle une fraction en mélange mais qui possède des signaux caractéristiques très déblindés autour de 14 ppm suggérant la présence de protons formants des liaisons intramoléculaires. La faible quantité de matière de cette fraction n'a pas permis de continuer sa purification à ce stade du projet (**Supp. Figure V.4**).



andrastine A (1) : CHO  
 andrastine B (2) : CH<sub>2</sub>OH  
 andrastine C (3) : CH<sub>3</sub>

**Figure V.6:** Structure des andrastines isolées

## 4. Discussion

Le métabolome de *Penicillium atramentosum* V2 est composé de nombreux métabolites bioactifs putatifs comme le complexe oxaline, méléagrine, glandicoline B et roquefortine C qui est typique du genre *Penicillium* (Ali et al., 2013). Ces composés ont des activités antimicrobiennes et antiprolifératives, l'oxaline et la méléagrine sont également des anticancéreux (García-Estrada et al., 2011; Newmister et al., 2018). Il a également été rapporté que la méléagrine pouvait avoir une activité antibiofilm sur *Staphylococcus aureus* (Hamed et al., 2021). Les atpenines, ici les atpenines A4, A5 et B, sont également régulièrement retrouvées chez des *Penicilliums*, ces composés ont des activités antifongiques mais également anticancéreuses, ils inhibent notamment le complexe mitochondrial II (Kumagai et al., 1990; Miyadera et al., 2003; Omura et al., 1988). Le métabolome de *Penicillium atramentosum* s'est également avéré être composé de nombreux cyclopeptides notamment des dicétopipérazines (13 composés). Ces composés sont connus comme des antibactériens notoires mais surtout des inhibiteurs de QS. Le métabolome de *P. atramentosum* V2 est composé de *cyclo*(Phe-Pro), *cyclo*(Val-Phe), *cyclo*(Val-Pro), *cyclo*(Val-Leu) et *cyclo*(Leu-Pro) déjà rapporté comme composés anti-QS (Bina et al., 2013; Bofinger et al., 2017; Hatanaka et al., 2020; Lee et al., 2018; Li et al., 2023; Park et al., 2006; Sun et al., 2016, 2020). Parmi les cyclopeptides, ceux composés d'un tryptophane sont particulièrement actifs contre les circuits du QS mais également contre la production de biofilm (Wang et al., 2022b), ici le métabolome de *P. atramentosum* V2 révèle la présence d'un *cyclo*(Leu-Trp).

Cependant, faute de quantité suffisante nous n'avons pas pu isoler de dicétopipérazines et les tester. Par ailleurs, nous avons également remarqué que le fractionnement de l'extrait entraînait la perte de certaines activités (antibiofilm ou anti-QS), les cyclopeptides étant également répartis dans de nombreuses fractions. On pourrait très bien imaginer une synergie de cet ensemble de dicétopipérazines anti-QS au sein de l'extrait, entraînant une perte partielle des activités lors du fractionnement.

Notre approche de fractionnement nous a permis d'isoler des andrastines, qui possèdent une activité anti-AHLs. Ces composés sont connus comme des inhibiteurs de l'activité des farnésyl transférases ce qui leur procurent un rôle antitumoral mais également une forte toxicité. Ainsi, le microbiote de *S. latissima* semble héberger des souches fongiques



susceptibles de produire de puissantes mycotoxines dangereuses pour l'homme, telles que les andrastines mais également la roquefortine C, l'acide sécalonique, la méléagrine, la glandicoline et l'oxaline que nous avons identifié. Les *Penicilliums* causent de nombreux problèmes en santé alimentaire à cause de ces mêmes toxines, notamment *Penicillium roqueforti* et *Penicillium oxalicum* qui possèdent un métabolome très similaire (Finoli et al., 2001; Steyn, 1970). *S. latissima* est principalement cultivée et consommée en Asie telle quelle ou bien transformée sans qu'aucun risque alimentaire n'ait été déclaré à ce jour. Cependant, dans un marché en pleine croissance mondiale et qui devrait se développer dans les années à venir en Europe, nos résultats suggèrent que ce risque n'est pas à négliger, et il semble donc important de considérer le microbiote associé aux algues et sa production métabolique dans la réglementation de consommation des algues.

## 5. Conclusion du chapitre

Au cours de ce projet, nous avons pu réaliser l'annotation de 70 % du métabolome de *P. atramentosum*, jusqu'alors peu étudié. Le métabolite responsable de l'activité antibiofilm n'a pas encore pu être identifié faute de temps et de quantité. Une culture à plus grande échelle est en cours pour tenter d'isoler une plus grande quantité du composé et envisager sa purification et analyse par RMN. Nous avons cependant isolé des andrastines qui ont une activité anti-QS forte, mais ces composés, particulièrement toxiques, ne pourront certainement pas être utilisés comme antifoulings durables. D'autres souches fongiques ont montré une activité anti-QS et antibiofilm comme *Penicillium chrysogenum* B5 et *Acremonium fuci* A4. Une amélioration des cultures d'*Acremonium fuci* A4 est à prévoir dans le but d'isoler des composés. Aux vues des toxines typiques du genre *Penicillium* produites par *Penicillium atramentosum* V2, *Penicillium chrysogenum* B5 pourrait avoir un métabolome très similaire à celui étudié. Du fait de la production de mycotoxines puissantes par *Penicillium atramentosum* isolé de l'algue brune *Saccharina latissima*, un suivi assidu devrait être mis en place pour les produits alimentaires dérivés de cette macroalgue.

## Chapitre VI. Discussion générale





L'objectif de cette thèse est d'approfondir notre compréhension de la nature et de l'importance des interactions microbiennes au sein de l'épimicrobiote des algues brunes avec pour modèle *Saccharina latissima*. En perspective, l'enjeu est d'identifier dans ce microbiote original, des métabolites bioactifs, anti-quorum sensing, pour des applications antifouling. Dans un premier temps, notre démarche a été de réaliser un inventaire de la diversité taxonomique et métabolomique des microorganismes de surface puis de corrélérer les métabolites aux microorganismes ou groupes de microorganismes présents. Le but de cette approche était de tendre vers un lien entre structure des communautés et fonctions des microorganismes. Dans un second temps, notre attention s'est portée sur l'exploration de la diversité et du rôle des mécanismes de communication cellulaire de type quorum sensing (QS) dans ces interactions. Nous avons cherché à décrypter la place du QS dans les dialogues moléculaires qui s'opèrent entre les différents partenaires microbiens afin de s'en inspirer pour révéler de nouveaux antifouling potentiels.

Au cours de nos investigations, nous avons identifié un core microbiote bactérien associé à un core métabolome, tandis que nous avons observé une diversité fongique très importante. Lors d'une expérience de perturbation du microbiote de surface à l'aide de composés synthétiques impliqués dans le QS, nous avons noté une variation significative du microbiote, suggérant un rôle clé du QS dans la stabilité et la régulation du microbiote. Par ailleurs, notre isolement et caractérisation des souches fongiques cultivables au sein de l'épimicrobiote algal a permis de mettre en évidence une forte abondance de métabolites impliqués dans les interactions microbiennes, dont un grand nombre de composés associés au QS. De surcroît, nous avons démontré que de nombreuses souches bactériennes et fongiques sont capables de communiquer au moyen de mécanismes de QS et de réguler la formation de biofilm. Parmi ces souches, certaines se sont révélées être des candidates particulièrement prometteuses pour l'isolement de nouveaux composés antifouling.

# 1. Les interactions microbiennes au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*

Dans une première phase de notre étude, nous avons entrepris une exploration de la diversité microbienne totale et des métabolomes de surface au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*. Cette approche intégrative, basée sur l'acquisition de jeux de données multi-omiques, représente une entreprise inédite dans le contexte des laminaires (Laminariales) jusqu'à présent. Par la suite, nous avons essayé de caractériser les interactions microbiennes régnant au sein de ce microbiote. Nous avons ainsi établi des associations entre des métabolites et des microorganismes, dans le but de dévoiler les liens possibles entre la structure, la composition des communautés et les fonctions assurées par les microorganismes.

## A. Un core microbiote bactérien

Par des approches de métabarcoding, nous avons identifié des communautés microbiennes diversifiées et spécifiques de l'algue brune *Saccharina latissima*, incluant des bactéries, des macro et micro-eucaryotes, ainsi que des champignons (**Chapitre II**). L'épimicrobiote algal est composé d'un core microbiote bactérien et eucaryote. Le core microbiote bactérien représente plus de 25% de la diversité bactérienne totale, et est composé d'Hyphomonadaceae; de Granulosicoccaceae; d'Enterobacteriaceae et de Rhodobacteraceae et de Flavobacteriaceae. Certaines de ces familles et genres bactériens ont également été isolés par des approches de culture (**Chapitre IV**) tels que les *Granulosicoccus* sp., *Sulfitobacter* sp. et *Dokdonia* sp.. Toutefois, lorsque l'on s'intéresse aux jeunes macroalgues cultivées en laboratoire, les Alteromonadaceae en particulier *Alteromonas* sp. et *Paraglaciecola* sp., prédominent, accompagnées des mêmes familles que le core microbiote notamment les Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae et Rhodobacteriaceae (**Chapitre III**).

La présence de ces microorganismes n'est pas surprenante car ces espèces ont déjà été mises en évidence chez des macroalgues brunes, et notamment des laminaires comme *Laminaria hyperborea* (Bengtsson et al., 2010; Burgunter-Delamare et al., 2023; Lachnit et al., 2010; Paix et al., 2019; Stratil et al., 2013). Les *Granulosiccoccus* sp., *Litorimonas* sp., *Hellae* sp. et *Blastospirulla* sp. avaient même déjà été identifiés au sein du microbiote total et endophyte de *Saccharina latissima* (Burgunter-Delamare et al., 2023; Tourneroché et al., 2020). La

prépondérance et la constance de ce core microbiote même en dehors du milieu naturel suggère qu'il pourrait jouer un rôle essentiel au sein du microbiote et dans la physiologie de *Saccharina latissima*. Certaines études ont révélé que les Rhodobacteraceae, telles que *Sulfitobacter* sp. et *Loktanella* sp., sont des colonisateurs primaires de macroalgues, produisant de la vitamine B12 et des sidérophores (Dogs et al., 2017; Paix et al., 2020, 2019). Les Flavobacteriaceae, dont *Algitalea* sp., appartiennent aux communautés bactériennes pionnières (Paix et al., 2020) et sont nécessaire à la décomposition de la matière organique lors de la prolifération d'algues (Burgunter-Delamare et al., 2023; Pinhassi et al., 2004; Riemann et al., 2000). De manière similaire au concept de « microbial gardening » exploré notamment par (Saha and Weinberger, 2019), les taxa pionniers pourraient alors être recrutés spécifiquement par l'algue afin de constituer une communauté défendant l'algue contre l'arrivée successive et le développement de potentiels pathogènes. Certaines bactéries peuvent aussi affecter négativement les macroalgues en décomposant le matériel cellulaire ou en provoquant des maladies, comme certains *Alteromonas* sp. (Peng and Li, 2013; Vairappan et al., 2001) et les *Pseudoalteromonas* sp. (Sawabe et al., 1998). Néanmoins, la prédominance d'*Alteromonas* sp. chez de jeunes algues saines cultivées en laboratoire suggère qu'elles ne sont pas toujours pathogènes et qu'elles jouent un rôle dans l'épimicrobiote. Par ailleurs, il a également été montré que des *Pseudoalteromonas* sp. ont de fortes capacités de colonisation des macroalgues et inhibent la croissance de pathogènes et de biofoulers (annélides polychètes par exemple) (Ballestriero et al., 2010; Bowman, 2007; Dahms and Dobretsov, 2017; Dobretsov and Rittschof, 2023; Holmström et al., 1998). Nos tests de formation de biofilm effectués sur les souches isolées du microbiote de surface de *Saccharina latissima* vont également dans ce sens. En effet, 90% des souches de *Pseudoalteromonas* sp. provenant d'algues saines sont capables de former du biofilm (**Chapitre IV**), et plus intéressant encore, 80% de ces souches sont également capables d'inhiber la formation de biofilm. Parmi les isolats appartenant partie du core microbiote de *Saccharina latissima*, 60% des souches isolées sont capables de former du biofilm dans nos conditions de culture. Afin d'approfondir notre connaissance du rôle du core microbiote bactérien, il serait intéressant de mener des expériences de cocultures de microorganismes en sélectionnant certaines de souches isolées. Les cultures seules et cocultures pourraient être inoculées à de jeunes pousses de *Saccharina latissima* préalablement traitées aux antibiotiques ou soumis à des pathogènes. Un suivi des communautés par des approches de

métagénomique, métatranscriptomique et métabolomiques (« multi-omiques ») pourrait être effectué afin d'évaluer les gènes et les métabolites impliqués dans la régulation du microbiote.

## **B. Composition et rôle des communautés fongiques au sein de l'holobionte algal et leurs implications dans le métabolome de surface**

La diversité et les rôles des communautés fongiques au sein de l'holobionte algal restent largement inexplorés. Nos résultats révèlent une faible diversité fongique (seulement 37 ASVs), juxtaposée à une variabilité interindividuelle particulièrement prononcée (**Chapitre II**) avec la présence notamment de *Cladosporium* sp., *Debaryomyces* sp., *Sporobolomyces* sp., *Malassezia* sp., *Penicillium* sp., *Stereum* sp. et *Rhodotorula* sp. Ces résultats sont cohérents avec nos approches de culture qui ne nous ont permis d'isoler que 10 espèces fongiques (**Chapitre IV**). Parmi ces espèces, on retrouve des *Penicilliums*, *Acremoniums* et *Aspergillus* ainsi que quelques souches uniques. Cette variabilité interindividuelle est tellement marquée que seuls les *Penicilliums* sp. ont été détectés au sein des 6 individus de *Saccharina latissima* étudiés dans ce travail de thèse, avec des approches de métabarcoding (**Chapitre II**). La présence d'*Acremonium* sp. est suspectée par la détection d'Hypocreales sans genre associé par les bases de données. Au sein de l'holobionte des jeunes algues cultivées en laboratoire (**Chapitre IV**), cette diversité interindividuelle est également marquée mais avec la présence de nombreuses familles et espèces fongiques que l'on retrouve également chez les adultes ou dans la fraction cultivable. Cependant, de manière surprenante, les *Sporobolomyces* sp. sont toujours présents, bien que leur abondance varie.

Le rôle des champignons dans les microbiotes algaux n'a été que très peu étudié mais certains auteurs ont mis en évidence que les champignons endophytes et épiphytes associés aux macroalgues brunes produisent également des composés antibiotiques, antifongiques, antioxydants et larvicides (Fan et al., 2019; Flewelling et al., 2015; Sarasan et al., 2017). Les souches fongiques isolées de l'épimicrobiote sont notamment capables de produire de nombreux composés possiblement bioactifs (antibiotiques, antifongiques, antibiofilm). Ces composés pourraient ainsi jouer un rôle dans la régulation du microbiote, la lutte contre les pathogènes et même peut-être le contrôle des dysbioses comme mentionné

chez les éponges, les coraux et les plantes (Deveau et al., 2018; Hassani et al., 2018; Raghukumar, 2012; Raghukumar and Ravindran, 2012; Roik et al., 2022; Suryanarayanan, 2012; Vallet et al., 2018). Par ailleurs, de nombreuses souches fongiques de notre collection se sont avérées capables d'inhiber la formation de biofilm lors des tests *in vitro* (**Chapitre IV**). Bien que les stratégies dépendantes de la culture perdent en popularité face aux approches multi-omiques, qui offrent une vue d'ensemble des communautés épiphytes, il est intéressant de noter qu'elles permettent ici de pouvoir comparer les métabolites produits *in vitro* à ceux trouvés à la surface de l'algue et d'émettre des hypothèses sur leur rôle au sein de l'holobionte algal (**Chapitre II**). D'une manière plus générale, les approches de culture permettent d'isoler des modèles biologiques sur lesquels travailler et tester des hypothèses. Les souches isolées permettent aussi de produire des composés en quantité suffisante pour être caractérisés chimiquement.

Ainsi, par des approches de métabolomique non ciblée (LC-MS/MS), nous avons caractérisé le métabolome de surface de *Saccharina latissima* afin d'identifier l'ensemble des métabolites produits (**Chapitre II**). Au sein du métabolome de surface de *Saccharina latissima*, nos analyses ont révélé 60 annotations putatives, dont 24 ont déjà été retrouvées chez des champignons. Parmi les métabolites présents, les acides gras notamment les acyles gras (12 composés) sont les métabolites les plus courants du métabolome et trois d'entre eux ont été retrouvés dans les métabolomes des souches fongiques isolées, le 9-octodecenamide, 13-docosenamide et l'icosanamide (**Chapitre IV**). Ces composés ont été identifiés dans certaines études comme des métabolites de défense chez les algues, car ils peuvent inhiber la virulence de pathogènes et rendre également l'algue toxique pour les brouteurs (Bertin et al., 2012; Nobori et al., 2018; Xiao et al., 2004). Par ailleurs, 51 acides gras aminés putatifs ont été détectés au sein des métabolomes. Nous avons également mis en évidence l'existence d'un core métabolome de surface chez *Saccharina latissima* composé de 8 métabolites putatifs, dont le diéthyle de phtalate, le dikojiacide A et l'arabinofuranosyluracile. Cependant, l'identification des organismes producteurs reste difficile en raison du manque d'information dans les bases de données et de la grande diversité des organismes présents à la surface de *Saccharina latissima*. Par exemple, la présence de diéthyle de phtalate, composé impliqué dans des interactions entre microorganismes, est assez courante et ce dernier est généralement produit par de nombreuses bactéries et des champignons (Al-Bari et al., 2005;



Huang et al., 2021, 2021; H. Zhang et al., 2018). Cette molécule a été détectée au sein des métabolomes de nombreux *Penicillium* sp. en culture. Le dikojiacide A est un dimère naturel d'acide kojique isolé de l'endophyte végétal *Aspergillus flavus* (Xu et al., 2018). Cependant, aucun *Aspergillus versicolor* de notre collection ne produit ce composé. L'arabinofuranosyluracile, également connu sous le nom de spongouridine, a été isolé de l'holobionte de l'éponge marine *Tectitethya crypta* et de la gorgone jaune *Eunicella cavolini* (Bergmann and Burke, 1956; Cimino et al., 1984). Sa production par *Vibrio harveyi*, présent également dans les cultures réalisées au cours de ce travail de thèse, a été démontrée (Bertin et al., 2015). Cependant, d'autres organismes épiphytes de *Saccharina latissima* pourraient être capables de produire ce composé appartenant au core métabolome. Nous ne possédons pas, dans ce travail de thèse, d'informations sur les métabolites produits par les bactéries isolées, et il aurait été très intéressant d'étudier également les métabolomes des souches bactériennes isolées. Les bactéries impliquées dans le fonctionnement du core microbiote bactérien pourraient également être impliquées dans la mise en place d'un core métabolome.

### **C. Corrélations entre la structure et les traits fonctionnels des communautés microbiennes à la surface de *Saccharina latissima***

Dans le but d'aller plus loin dans la compréhension des liens entre la structure des communautés et les fonctions des microorganismes colonisateurs de la surface de *Saccharina latissima*, nous avons corrélié les données de diversité microbienne avec celles des métabolomes de surface (**Chapitre II**). Par des approches d'Analyse Factorielle Multiple (MFA), en utilisant le package *FactoMineR* de R (Lê et al., 2008), nous avons tout d'abord observé que les communautés microbiennes et les métabolomes de surface sont relativement similaires chez 4 des 6 individus étudiés et ce malgré les disparités observées dans les communautés fongiques. Cette observation suggère que ce sont les champignons qui produisent les métabolites qui sont responsables des variations observées entre les différentes algues échantillonnées alors que les bactéries du core microbiote émettent des composés similaires dans épimicrobiotes des 4 individus. Par la suite, nous avons mis en évidence chez les deux autres individus, une variation significative des communautés microbiennes associées à des métabolites spécifiques.

Ces variations, des communautés bactériennes d'une part, et fongiques d'autre part, chez ces deux individus, impliquent des métabolites associés à des interactions microbiennes et potentiellement impliqués dans la défense de l'algue (**Chapitre II**) (Bertin et al., 2015, 2012; De Nys et al., 1995; Harder et al., 2012; Saha et al., 2011). Ces composés putativement annotés sont différents mais leur classe et leur structure sont proches (acide gras aminés, acides aminés et composés du QS). Cette observation pourrait être expliquée par une redondance fonctionnelle de ces organismes présents dans l'épimicrobiote algal. Dans ce sens, il a été montré que l'état de santé des cultures axéniques d'*Ulva* sp., pouvait être restauré par l'inoculation de bactéries ayant les mêmes fonctions que celles initialement présentes (Provasoli and Pintner, 1980). D'autres auteurs ont également montré que la croissance et la morphogénèse pouvaient être rétablies par l'ajout de Rhodobacteraceae et Flavobacteriaceae produisant de la thallusine, ainsi que des phytohormones cytokiniques essentielles (Alsufyani et al., 2020; Spoerner et al., 2012). Ces mêmes types de mécanismes pourraient exister au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*. Dans notre cas, la majeure partie des composés produits semble impliquée dans la régulation de la défense de l'algue face aux pathogènes et aux brouteurs. Dans ce sens, un résultat frappant est la présence de furanones et buténolides putatives à la fois au sein de l'épimicrobiote algal (**Chapitre II**) mais également au sein des métabolomes des souches fongiques isolées (**Chapitre IV**). Ces composés, impliqués dans des mécanismes de défenses, covarient au sein de l'épimicrobiote algal avec *Penicillium* sp., *Sistotrema* sp. et *Sporobolomyces* sp. et sont produits par certaines souches de *Penicillium* sp. et celle affiliée à *Paradendryphiella salina* de notre collection. Ces composés sont connus pour être de puissants inhibiteurs du QS et pour être impliqués dans la régulation du biofouling chez les macroalgues (Case et al., 2011; de Nys et al., 1993; Egan et al., 2014). Cependant, les furanones sont généralement produites par l'algue, comme chez *Delisea pulchra* et rarement au sein du microbiote de surface des macroalgues (De Nys et al., 1995; de Nys et al., 1993).

En conclusion, nos résultats ont mis en lumière la forte diversité des microorganismes et des métabolites associés, soulignant une variabilité significative des communautés fongiques au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*. Nous avons également constaté que certains métabolites impliqués dans les interactions microbiennes présentent une covariation avec des consortia de microorganismes, notamment des consortia variables d'un

individu à l'autre. Ces observations mettent en évidence que l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* est le siège d'une forte diversité microbienne qui structure les métabolomes de surface.

Afin d'aller plus loin dans l'étude des interactions microbiennes régnant au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*, il serait nécessaire d'approfondir ces travaux à l'aide d'études de métagénomique et de métatranscriptomique. Ces approches nous permettraient de mieux associer les taxons identifiés à certaines voies métaboliques clefs (par des approches de métagénomique), puis d'associer ces ensembles aux voies métaboliques exprimées (métatranscriptomique). De tels travaux nous permettraient également d'avoir une vision plus précise du rôle de chaque microorganisme au sein du microbiote de surface de *Saccharina latissima*. Par ailleurs, il serait intéressant de conduire des expérimentations de perturbation du microbiote en condition contrôlées en modifiant des facteurs biotiques (ajout de souches pathogènes, de brouteurs, de matières organiques) et abiotiques (pH, température, luminosité), facteurs pouvant perturber les communautés microbiennes. Une description de l'évolution au cours du temps du microbiome par des approches couplées et corrélées de métagénomique, métatranscriptomique et métabolomique permettrait de mieux comprendre les dynamiques et le rôle des communautés microbiennes dans la physiologie des macroalgues.

## 2. Importance du Quorum Sensing dans les interactions au sein de l'holobionte algal

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux composés impliqués dans les interactions à la surface de *Saccharina latissima* avec un intérêt particulier pour le QS. Les objectifs étaient de déterminer quels sont les composés produits par les microorganismes impliqués dans des interactions mais également d'appréhender la diversité et le rôle des composés du QS dans ces interactions. Ces approches permettent de comprendre le rôle du QS dans la régulation du biofilm de surface de *Saccharina latissima*.

## A. Une grande diversité de composés impliqués dans les interactions microbiennes

Notre analyse des métabolomes des 42 souches fongiques isolées (**Chapitre V**) a révélé que les champignons sont des producteurs de composés possiblement impliqués dans des interactions microbiennes. Ces métabolites, représentant 17% des métabolites totaux détectés, sont de familles diverses et comprennent des acides aminés, des acide gras (dont des acides gras aminés), des terpénoïdes, des pré-nol lipides et des indoles. Leurs activités sont possiblement tout aussi diverses, ce sont des antibactériens putatifs (18 composés) comme la pénicilline G et l'acide aspergillique ; des antifongiques putatifs (10 composés) dont la mycosamine et la streptovercilline, des antimicrobiens plus généraux (26 composés) comme la drechmerine C et la patulolide B mais également des inhibiteurs de QS (25 composés) notamment la *O*-ethylhydroxydihydrofusarubine et le *cyclo*(pro-val). Par ailleurs, nous avons mis en évidence deux algicides putatifs le *cyclo*(leu-*trans*-4-hydroxy-pro) et la *N*-methyl-2-(2-methylpropoxy)aniline (An et al., 2015; Guo et al., 2015). Des composés fongiques impliqués dans la signalisation chimique des plantes ont également été identifiés comme le régulateur de croissance pironétine (Dias et al., 2003), un composé impliqué dans la signalisation des plantes, la gibbérelline A12 (Davière and Achard, 2013) et un inhibiteur de la croissance des racines, l'aspergimarine D (Huang et al., 2019). Ces composés fongiques possèdent une grande diversité de cibles biologiques potentielles, que ce soit envers des microorganismes, des algues ou des plantes (plantes et algues) suggérant ainsi que les champignons pourraient être à même d'interagir avec l'ensemble des membres des communautés présentes à la surface de *Saccharina latissima*.

Cependant, parmi tous ces métabolites fongiques, seuls des acides gras aminés et des diéthyl phtalates, potentiellement impliqués dans ces interactions d'après les données de la littérature, ont été retrouvés au sein des métabolomes de l'épimicrobiote algal (Bertin et al., 2012; Huang et al., 2021; H. Zhang et al., 2018). Cette observation peut être expliquée par la variabilité interindividuelle des communautés fongiques, qui ont été isolées sur d'autres individus que ceux étudiés dans le **Chapitre III**. Il est également important de noter que certains de ces composés retrouvés au sein des métabolomes fongiques sont hautement toxiques pour les microorganismes ou les plantes (Chawla and Wenzel, 1987; Kovalakova et al., 2020; Spiteller, 2015), et pourraient entraîner des effets néfastes sur l'algue et le

microbiote. Ceci suggère que pour maintenir le microbiote algal, des processus de rétrocontrôle des communautés fongiques mis en place par l'algue, les bactéries ou les champignons, sont nécessaires.

## **B. Rôle des composés du QS dans les interactions de l'épimicrobiote algal**

Parmi les différents médiateurs chimiques mis en évidence dans le **Chapitre V**, les molécules de QS ont suscité notre intérêt de par leur rôle clé dans la communication entre microorganismes, dans la formation et le maintien des biofilms (Fuqua et al., 1994; Nealson, 1977; Schulz, 2014). Comme précédemment montré, les champignons sont de forts producteurs de composés impliqués dans les interactions au sein de l'épimicrobiote algal et les données indiquent de nombreux composés putatifs aux activités anti-QS. Notre objectif était d'évaluer si les souches fongiques isolées étaient capables de réguler le microbiote par des mécanismes du QS. Ainsi, nous avons testé les capacités des souches fongiques isolées de l'épimicrobiote de *S. latissima* à inhiber les mécanismes du QS (**Chapitre V**). Nos résultats ont montré le fort potentiel d'inhibition du QS des souches isolées dans nos études (95% des souches), notamment des mécanismes de QS reposant sur l'émission des AHLs et des AI-2. Cette activité anti-QS des champignons marins a déjà été démontrée par quelques auteurs dans l'environnement marin (Chang et al., 2021; Dobretsov et al., 2011a; Naik et al., 2013; Parasuraman et al., 2020b) et chez des champignons endophytes d'algues brunes (Tourneroché et al., 2019; Vallet et al., 2018). Cependant, à notre connaissance, la présence de telles activités chez des souches fongiques épiphytes de macroalgues n'a pas été documentée. Par ailleurs, nos résultats montrent que 57% des souches fongiques sont capables d'inhiber la formation de biofilm bactérien, ajoutant un élément à l'hypothèse d'une régulation du biofilm par des composés du QS. En parallèle, nous avons également voulu évaluer si les bactéries de notre collection étaient capables de former du biofilm et de produire des composés impliqués dans le QS. Ainsi, 59% des souches de la collection bactériennes sont capables de faire du biofilm et un total de 40 % des souches bactériennes sont capables de produire des AHLs (AHLs à chaînes courtes, moyennes et longues) et 44 % des souches communiquent possiblement par l'émission d'AI-2. Ces résultats suggèrent que les bactéries de l'épimicrobiote algal produisent des composés du QS et qu'ils pourraient être impliqués dans la formation et le maintien du biofilm associé à la surface de *Saccharina*

*latissima*. Dans l'ensemble, cette étude montre que les champignons possèdent un potentiel de régulation du biofouling bactérien à la surface de *Saccharina latissima* en inhibant les mécanismes du QS impliqués dans la formation de biofilm.

Cependant, 87,5 % des souches bactériennes inhibent également la production d' AHLs à chaînes courtes et 65 % celles d' AHLs à longues chaînes, mais seulement 3 % des souches sont capables d'inhiber la communication reposant sur l'émission d'AI-2 et seulement 8 % présentait une inhibition de la formation de biofilm. Le spectre des composés du QS, comprenant des activateurs et des inhibiteurs, émis parfois par les mêmes souches bactériennes, présente une diversité remarquable, sans association exclusive à un genre bactérien. Nos résultats montrent ainsi que les communautés bactériennes et fongiques pourraient influencer la formation du biofilm se développant à la surface de *Saccharina latissima*. Les fortes capacités de communication identifiées suggèrent aussi que le QS pourrait jouer un rôle crucial dans le maintien de ce biofilm.

Par ailleurs, nos résultats obtenus sur les jeunes sporophytes de *Saccharina latissima* (**Chapitre IV**) indiquent qu'une activation du QS par ajout d'AHLs de synthèse au sein de l'épimicrobiote entraîne une perturbation du microbiote sur le long terme mais sans apparition de pathogènes potentiels. Un ajout de furanones, potentiellement anti-QS, entraîne en revanche un effet délétère sur le microbiote caractérisé par le développement de souches potentiellement pathogènes. Nos résultats semblent également indiquer que des mécanismes de compensations se mettent en place. En effet, les communautés microbiennes reviennent à leur état initial en moins de 24h après la perturbation induite par ajout de composés du QS (C6-HSL ou furanone) sur les microbiotes de surface. Ces résultats mettent en évidence l'importance cruciale du QS au sein du microbiote de surface de *Saccharina latissima*. Par la suite, nous allons nous pencher sur les métabolites impliqués dans ces régulations en analysant l'évolution des métabolomes au cours du temps dans les différentes conditions testées.

Les champignons pourraient contribuer à ces régulations très fines du microbiote de surface de *Saccharina latissima*. En effet, nous avons démontré que les souches fongiques cultivables de l'épimicrobiote produisent divers signaux QS (**Chapitre V**) capables d'être des activateurs comme le précurseur 2-heptylquinoline-4(1H)-one (HHQ) (Schütz et Empting, 2018), ou des inhibiteurs comme les cyclopeptides (5) (Lee et al., 2018 ; Li et al., 2023 ; Wang

et al., 2022 ; Yu et al., 2021). De nombreuses coumarines putatives (8 composés), des furanones et des buténolides (2 composés) ont également été détectés et ces molécules sont fréquemment associées à des activités anti-QS et antibiofilm (De Nys et al., 1995; Gutiérrez-Barranquero et al., 2015; Lee et al., 2014; Phainuphong et al., 2017; Proctor et al., 2020; Reen et al., 2018) Par ailleurs, des coumarines (2 composés) et des furanones (1 composé) avaient également été détectées au sein des métabolomes de surface de *Saccharina latissima*, confirmant l'implication du QS dans le microbiote de surface (**Chapitre III**). Cependant, l'origine biosynthétique des coumarines au sein de l'holobionte algal n'a pas pu être déterminée par notre approche.

Pour conclure, nos résultats suggèrent que les champignons épiphytes peuvent jouer un rôle régulateur au sein de l'épimicrobiote de *S. latissima*, en particulier en façonnant les communautés bactériennes agissant sur les mécanismes de QS via la production d'inhibiteurs ou d'activateurs du QS. Collectivement, nos résultats établissent que les souches fongiques provenant de l'épimicrobiote des macroalgues brunes pourraient représenter une source précieuse de composés anti-QS et antibiofilm d'intérêt.

### 3. Recherches d'antifoulings potentiels au sein des métabolomes fongiques

La recherche de nouveaux antifoulings éco-compatibles est un enjeu majeur de transition environnementale. Notre stratégie pour relever ce défi est de cibler les mécanismes clés impliqués dans la formation de biofilm, notamment le QS. Ces composés inhibent la formation de biofilm sans affecter la viabilité cellulaire, et engendrerait ainsi potentiellement moins de toxicité que les solutions actuelles. Pour cela, nous nous sommes inspirés du dialogue moléculaire au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* pour tenter d'isoler de nouveaux composés à activité anti-QS et antifouling.

Au cours de cette thèse, nous avons démontré que les champignons isolés, notamment les souches *Penicillium atramentosum* V2, *Acremonium fuci* A4 et *Penicillium chrysogenum* B5, sont de forts producteurs d'inhibiteurs du QS, inhibant également la formation de biofilm (**Chapitre IV**). À l'issue de nos analyses des métabolomiques, de nombreux composés demeurent inconnus et pourraient posséder une activité QS ou anti-QS. De plus, un certain nombre de composés aux activités antibactériennes, antimicrobiennes ou anticancéreuses

présentent des structures très similaires aux furanones et buténolides, mais n'ont jamais été testées pour leur capacité à inhiber le QS et la formation de biofilms (Luo et al., 2021). Ainsi les souches fongiques marines de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* sont une grande source de potentiels antifoulings. Les métabolomes des bactéries n'ont pas été étudiés dans ce travail de thèse faute de temps, mais une large fraction d'entre elles s'est avérée inhibitrice du QS et de formation de biofilm au cours de nos tests. Elles pourraient également être des candidates envisageables pour la recherche d'antifoulings. Cependant, les bactéries sont connues pour exercer des activités anti-QS par la production de lactonases ou d'acylases. Ces enzymes peuvent néanmoins se révéler instables et leur intégration dans des revêtements antifoulings est plus complexe. Notre intérêt s'est donc tourné vers les souches fongiques connues pour produire une grande diversité de métabolites secondaires bioactifs.

Nous avons étudié en détail le métabolome de *Penicillium atramentosum* V2, souche fongique dont l'activité s'est révélée antibiofilm, anti-QS et non toxique lors de nos biotests (**Chapitre V**). Le métabolome de cette souche s'est avéré être composé de nombreux métabolites bioactifs putativement annotés comme des anticancéreux, des mycotoxines et des antibiotiques qui étaient pour la plupart connus et caractéristiques du genre *Penicillium*. Malgré la présence de nombreux métabolites majoritaires connus, l'extrait a tout de même été fractionné et chaque fraction a été testée pour caractériser ses activités anti-QS et antibiofilms (4 biotests). Dans un premier temps, nous avons pu observer que le fractionnement de l'extrait entraînait la perte de certaines activités. Ces résultats ont mis en évidence que différents composés étaient impliqués dans chacune des bioactivités testées. Nous avons caractérisé les fractions les plus actives et mis en évidence par RMN des andrastines notamment les andrastine A, andrastine B et andrastine C comme composés anti-QS (AHLs) et contre le biofilm de *Labrenzia* sp. BBCC2184. Cependant, ces composés, utilisés comme anticancéreux, font l'objet d'une attention particulière quant à leur toxicité (Fernández-Bodega et al., 2009; O'Brien et al., 2006). Par manque de biomasse d'extraits, nous n'avons malheureusement pas pu encore caractériser tous les composés des fractions actives mais ces analyses sont en cours au MCAM. L'analyse du métabolome d'*Acremonium fuci* A4 devrait également être effectuée dans ce laboratoire.

La toxicité manifestée par certains composés anti-QS souligne la nécessité d'examiner la spécificité des composés déjà isolés et de comprendre leurs mécanismes d'action avant leur



utilisation. De surcroît, il est essentiel d'étudier les produits de dégradation et de métabolisation de ces composés par d'autres microorganismes, car certains pourraient avoir des effets nuisibles sur l'environnement. Une thèse en cours au LBBM se consacre précisément à cette problématique. De plus, afin d'inhiber efficacement la formation de biofilm, les composés isolés doivent interférer avec les différents mécanismes mis en jeu. Par exemple, les AHLs et les AI-2 doivent être inhibés car les bactéries pourraient aisément commuter entre ces voies de signalisation pour élaborer leur biofilm. L'inhibition du QS par les composés bioactifs doit donc être maximale, ciblée et efficace à très faible concentration (Dahms and Dobretsov, 2017).

Il a également été montré que pour conserver l'activité anti-encrassement des furanones, le groupement fonctionnel et leur lipophilie doivent être conservés (Clare et al., 1999; Xu et al., 2010). Aussi l'intégration de ces molécules dans des peintures antifouling se révèle plus complexe qu'il n'y paraît. Le développement d'une peinture antifouling efficace nécessite que la molécule active soit également stable dans le temps et qu'elle résiste aux variations de température et à la nature des solvant utilisés, tant pendant la fabrication que lors de son utilisation. De plus, elle doit être facilement synthétisable chimiquement ou purifiable à partir de microorganismes (les macroorganismes sont à exclure). Un projet financé par le CNRS est en cours entre nos deux laboratoires et tente d'incorporer des composés anti-QS dans des peintures antifouling. En conclusion, bien que de nombreux composés antifouling existent déjà, la recherche de nouvelles molécules continue d'être essentielle en raison de préoccupations liées à leur toxicité et à leur spécificité. L'optimisation de leur utilisation dans des peintures antifouling implique des défis liés à la stabilité, à la synthèse et à la purification, ainsi qu'à la compréhension des mécanismes de fonctionnement des composés bioactifs.

Pour conclure, nous avons déterminé des souches candidates potentielles pour isoler de nouveaux composés antifouling mais nous n'avons pas pu isoler encore ces composés nouveaux faute de biomasses suffisantes. Par ailleurs, il semble que l'activité de certaines souches fongiques repose sur une synergie d'activité de différentes molécules mais la présence de nombreuses toxines au sein des métabolomes sous-entend que des précautions doivent être prises quant à leur utilisation. Les composés devront être testés pour leur toxicité sur les micro- et macro-organismes afin de vérifier leur éco-compatibilités.

## Conclusion générale

Le microbiote de surface de *Saccharina latissima*, comme celui de nombreuses macroalgues, se révèle être un biofilm dynamique, hébergeant une multitude de microorganismes aux interactions complexes, largement médiées par la production de composés chimiques. Parmi ces interactions, le QS émerge comme un acteur de premier plan, sa perturbation impacte significativement la stabilité et la régulation du microbiote de surface. Les microorganismes présents à la surface de *Saccharina latissima* semblent être particulièrement bien structurés et associés à des métabolites bien spécifiques dont le rôle précis reste encore à explorer. Les champignons, notamment, semblent occuper une position centrale dans ces interactions en produisant à la fois des composés qui peuvent influencer les interactions de l'holobionte et des inhibiteurs du QS. Malgré ces avancées, les mécanismes précis de ces communications demeurent en grande partie non élucidés. La compréhension de ces mécanismes offre ainsi une perspective de bio-inspiration pour la recherche de nouveaux composés anti-QS et antibiofilm. Ces approches ouvrent la porte à la découverte de nouveaux antifoulings éco-compatibles, plus durables. En somme, ces avancées contribuent à la fois à notre compréhension de l'écosystème microbien associé aux macroalgues et ouvre de nouvelles perspectives vers le développement de solutions innovantes pour contrer les problèmes liés aux biofilms et au biofouling. Ainsi, il apparaît essentiel de poursuivre ce type de recherche de nouveaux composés bioactifs, tout en y associant un volet fondamental permettant de mieux appréhender leurs rôles en écologie marine.



# Annexe I : Méthodologies générales

L'objectif de ce chapitre est de présenter l'ensemble des approches et les modèles biologiques utilisés dans ce travail de thèse.

## 1. Échantillonnages d'épimicrobiote de *Saccharina latissima*

### A. Pré Requis pour l'échantillonnage de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*

Afin d'identifier et comprendre les interactions au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*, il est impératif de prélever des échantillons du biofilm qui recouvre sa surface. Les méthodes d'échantillonnage à cet égard sont relativement peu explorées, la plupart des auteurs ayant opté pour le broyage complet des algues, englobant ainsi la totalité du microbiome associé. Ainsi, nous avons élaboré une nouvelle méthode d'échantillonnage spécifiquement destinée à l'épimicrobiote des algues, visant à préserver l'intégrité des tissus algaux. Ces procédures d'échantillonnages ont dû être conçues en respectant un ensemble de contraintes majeures :

- Préserver l'intégrité des algues

Il est primordial de ne pas découper les algues, car toute opération de découpe en vue de séparer les étapes d'extraction (telles que l'agitation des tissus pour l'extraction d'ADN ou le trempage dans le MeOH) peut entraîner la libération de métabolites ou d'organismes endophytes.

- Maximiser la surface échantillonnée

Des études antérieures ont démontré que les communautés microbiennes varient en fonction de l'espèce d'algue et de la zone échantillonnée (thalle, apex, crampon). Il a également été mis en évidence que ces communautés présentent une organisation en gradient et en patch le long du thalle (Burgunter-Delamare et al., 2023; Lachnit et al., 2009; Paix et al., 2020). Afin de minimiser ces variations, l'échantillonnage doit être effectué en

couvrant la totalité du thalle et en privilégiant des individus juvéniles d'une taille d'environ 1 mètre.

- Cohérence entre diversité microbienne et métabolomique

Pour établir des corrélations significatives entre la diversité microbienne et la diversité métabolomique, il est essentiel que les échantillons proviennent du même individu. De plus, les méthodes de prélèvement doivent être compatibles et non destructives (pour préserver l'intégrité de l'algue). Par exemple, un trempage de l'algue dans le méthanol entraîne une destruction du biofilm, rendant impossible l'accès à la diversité microbienne. De même, le grattage au scalpel d'une zone de l'algue pour le métabarcoding peut empêcher le trempage ultérieur dans le méthanol, risquant ainsi d'extraire les métabolites de l'algue.

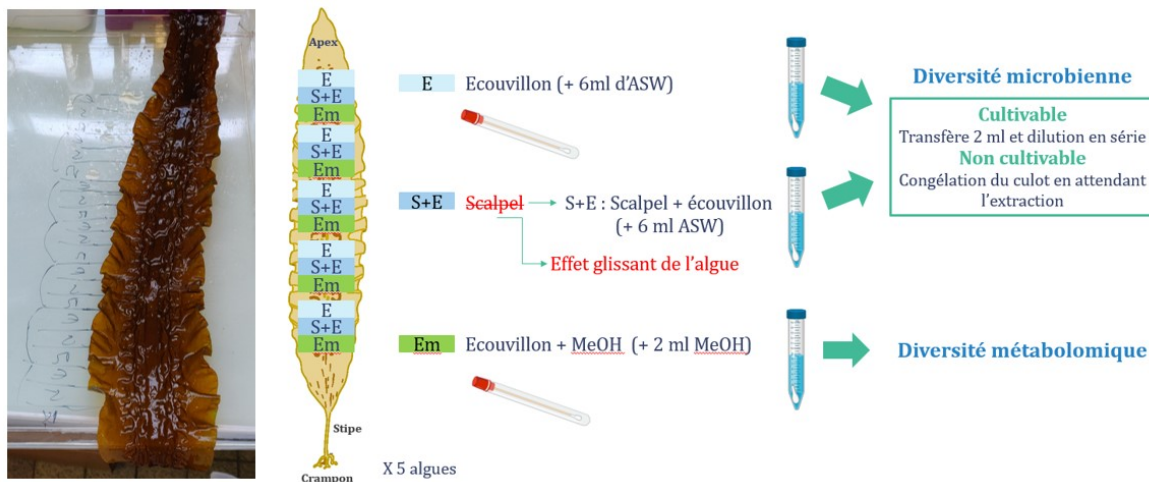
- Dimension de l'algue

Au vu des dimensions de *Saccharina latissima*, qui peut atteindre 2 mètres, il est important de prendre en considération cette taille lors de la planification de la méthode d'échantillonnage. Par conséquent, il n'est pas possible d'immerger complètement l'algue dans un récipient contenant de l'eau de mer et de la soumettre à une agitation prolongée de 1 heure (vortex ou ultrason) pour prélever le biofilm de surface.

## **B. Méthodologie d'échantillonnage de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima***

Lors du premier échantillonnage, de jeunes *Saccharina latissima*, mesurant moins de 1 mètre ont été collectées à la main à Perharidy (48°43'47.0 "N 4°00'17.1 "W), Roscoff (Bretagne, France), en janvier 2021 à marée basse (coefficient 93). Cinq macroalgues ont été sélectionnées au hasard, collectées et mises dans des sacs plastiques stériles après vérification de leur état de santé, seuls les individus sains ont été conservés. Un total de 5 individus a été rapidement transporté au laboratoire dans une glacière à environ 4 °C puis placé en chambre froide en attendant les prélèvements (maximum 2h) (Burgunter-Delamare et al., 2023, 2022). Les algues ont été rincées à l'eau de mer stérile (NSW, Natural Seawater) puis ont été délimitées en 3 zones de 15cm<sup>2</sup> chacune, selon un schéma alternatif (**Figure A1.1**). Les zones « écouvillon » et « scalpel + écouvillon » ont été exploitées pour prélever la diversité microbienne cultivable (**Chapitre IV**) et non cultivable présente à la surface des algues

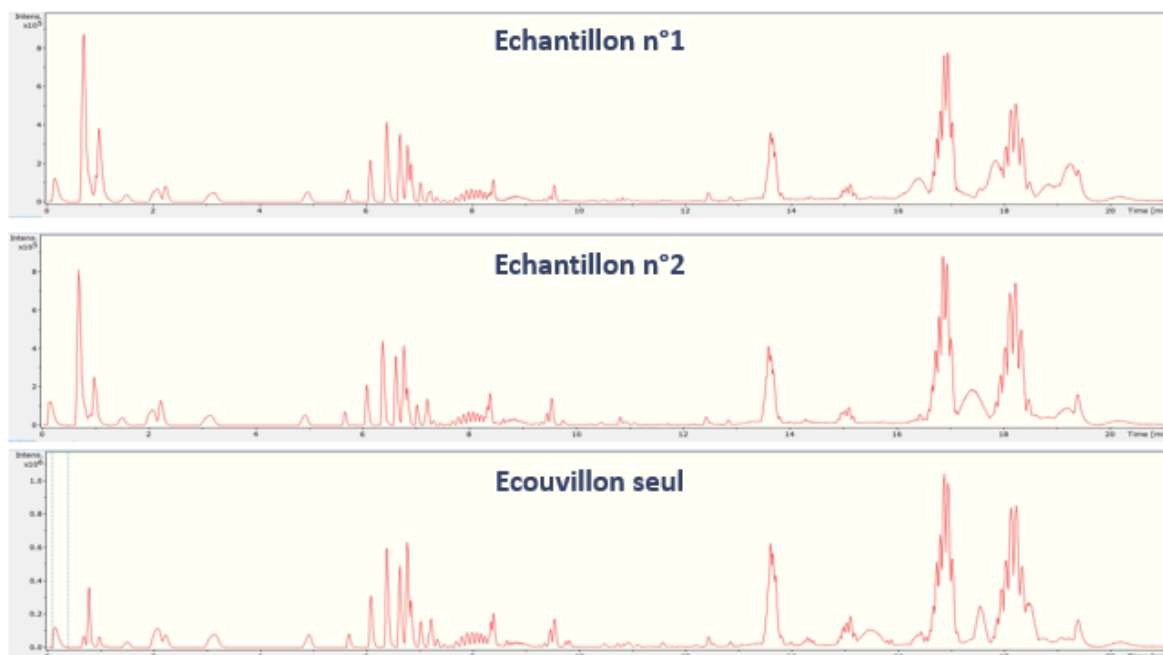
(Bengtsson and Øvreås, 2010). La zone dénommée « écouvillon + MeOH » a été utilisée pour extraire le métabolome de surface. Initialement la zone « scalpel + écouvillon » était destinée exclusivement au prélèvement au scalpel, mais la surface glissante de l'algue a entravé la collecte du biofilm, ce qui a conduit à son ajustement.



**Figure A1.1** : Méthodologie de l'échantillonnage 1 de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* (janvier 2021)

Les échantillons d'ADN ont été vortexés et transférés dans le tube Lysing Matrix E du kit FastDNA™ SPIN pour le sol (M.P. Biomedicals). L'extraction de l'ADN a été réalisée en suivant les recommandations du kit sans aucune modification. Ensuite, l'ADN extrait a été quantifié avec un fluorimètre Quantus (Promega) et la qualité a été vérifiée avec un spectrophotomètre/fluorimètre DeNovix® DS-11 FX+. Les échantillons d'ADN étaient de bonnes qualités et la méthode a été confirmée et utilisée dans le **Chapitre II** de ce travail de thèse. Toutefois, il est important de noter qu'une extraction réalisée dans de l'eau de mer peut entraîner la présence d'inhibiteurs de PCR lors des analyses de métabarcoding. Par conséquent, il est préférable de conserver les échantillons d'ADN dans de l'eau distillée.

Par ailleurs, les résultats des analyses par LC-MS/MS effectuées sur les échantillons de métabolome de surface ont indiqué que tous les composés détectés étaient des contaminations provenant des écouvillons (**Figure A1.2**).



**Figure A1.2 :** Spectre de LC-MS des échantillons du métabolome de surface de *Saccharina latissima* contaminé par les composés présents dans les écouvillons.

### C. Mises en place des méthodes d'extractions des métabolomes de surface

Afin de mettre en place une méthode efficace d'extraction des métabolomes de surface de *Saccharina latissima*, nous avons effectué nos expérimentations en utilisant des sporophytes juvéniles mesurant de 7 à 8 cm de longueur. Les différentes méthodes d'extraction ont été sélectionnées en nous appuyant sur des références bibliographiques portant sur l'extraction de métabolomes ou d'organismes épiphytes similaires. Les détails des méthodes sont présentés dans le **Tableau A1.1**.

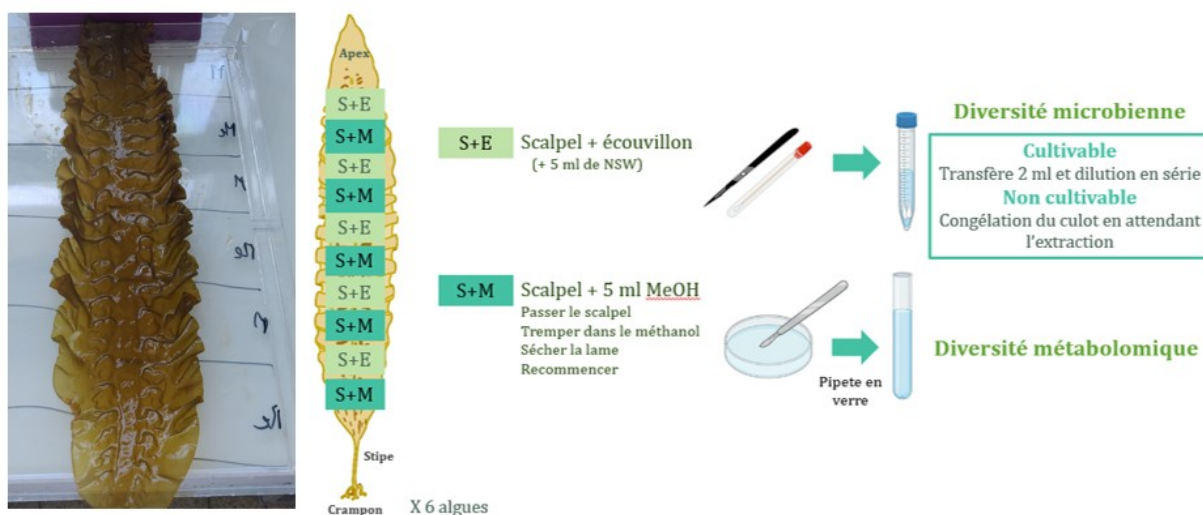
N°	Méthode de prélèvement	Étapes supplémentaires	Solvant	Inconvénients	Résultats	Inspiré de :
1	Grattage au scalpel puis à l'écouvillon	-	MeOH		Contaminé	(Lachnit et al., 2010; Othmani et al., 2013; Parrot et al., 2019)
2	Grattage avec du coton bio stérile	-	H <sub>2</sub> O		Contaminé	
3	Grattage au scalpel puis à l'écouvillon	Prélèvement du surnageant puis extraction à l'acétate d'éthyle	NSW + EtOAc		Contaminé	(Lachnit et al., 2010; Othmani et al., 2016a; Parrot et al., 2019)

4	Grattage au scalpel puis à l'écouvillon	Filtration de l'écouvillon puis ajout de MeOH	NSW + MeOH		Faible signal	(Lachnit et al., 2010; Othmani et al., 2016a; Parrot et al., 2019)
5	Grattage au scalpel puis à l'écouvillon	Filtration de l'écouvillon puis ajout d'EtOAc	NSW + EtOAc		Faible signal	(Lachnit et al., 2010; Othmani et al., 2016a; Parrot et al., 2019)
6	Grattage au scalpel	Récupération à l'essoreuse à salade	NSW		Aucun signal	(Lachnit et al., 2013)
7	Scalpel et transfert dans le MeOH	Séchage du scalpel entre les allers-retours	MeOH	Jusqu'à 3 allers-retours du scalpel dans le MeOH	Signal satisfaisant	
8	Trempage du verso de l'algue dans le MeOH (4sec)	Grattage de la face recto pour le métabarcoding	MeOH	Difficulté d'adaptation aux algues adultes	Aucun signal	(Othmani et al., 2016a; Paix et al., 2019)
9	Extraction dans une boîte de Petri du verso de l'algue	Grattage de la face recto pour le métabarcoding	C18 en poudre	Difficulté d'adaptation aux algues adultes	Aucun signal	
10	Dépôt du plantule sur une lame et laisser sous pression 24h	Grattage de la face recto pour le métabarcoding	Lame de C18 + MeOH	Difficulté d'adaptation aux algues adultes	Aucun signal	
11	Dépôt du plantule sur une lame et laisser sous pression 24h	Grattage de la face recto pour le métabarcoding	Lame de silice + EtOAc	Difficulté d'adaptation aux algues adultes	Aucun signal	
12	Grattage avec un filtre en verre stérile calciné	Filtration pour éliminer les résidus de verres	H2O distillé		Signal satisfaisant	

**Tableau A1.1:** Méthodes d'extraction des métabolomes de surface de *Saccharina latissima*

Certaines méthodes se sont avérées inefficaces ou entraînant des contaminations chimiques dans les échantillons. Cependant, plusieurs méthodes se sont avérées prometteuses pour l'extraction du métabolome de surface de *Saccharina latissima*. Pour le deuxième échantillonnage, nous avons opté pour la méthode du scalpel trempé dans le MeOH (**Figure A1.3**). Les échantillons ainsi obtenus ont permis d'établir une corrélation entre la diversité microbienne et le métabolome de surface, dont les résultats sont détaillés dans le **Chapitre II**.





**Figure A1.3:** Méthodologie de l'échantillonnage 2 de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima* (juin 2021)

Cependant, il convient de noter que la méthode du grattage au scalpel exige que les algues présentent à la fois une robustesse suffisante pour être grattées sans se déchirer et une taille adéquate permettant d'alterner entre les zones destinées au prélèvement microbiens et celles dévolues aux métabolomes de surface. Cette méthode s'est révélée inapplicable lors de la réalisation du **Chapitre III**, au cours duquel nous avons exposé, au cours du temps, de jeunes sporophytes de *Saccharina latissima* à des composés impliqués dans les mécanismes du quorum sensing (QS), un mécanisme de communication reposant sur la densité cellulaire. À cette fin, nous avons préféré opter pour le grattage des algues à l'aide d'un filtre en verre de plus petit diamètre. Ce filtre en verre a été subdivisé en deux parties distinctes : l'une destinée au métabarcoding a été mise en contact avec 2 ml d'eau distillée, tandis que l'autre partie, réservée à l'analyse métabolomique, a été immergée dans 2 ml de méthanol (MeOH). Néanmoins, il est à prévoir que l'utilisation de filtres en verre laisse de fines fibres de verre résiduelles au fond des tubes. Il a été nécessaire de procéder à de multiples étapes de filtration pour les éliminer intégralement avant de procéder à l'analyse en spectrométrie de masse.

## D. Préparation des échantillons pour les analyses multi-omiques

Les échantillons d'ADN ont été extraits conformément à la méthode précédemment décrite, tandis que les échantillons destinés à l'analyse métabolomique ont été solubilisés à une concentration de 10 mg/ml dans du méthanol (MeOH) avant d'être soumis à l'analyse par LC-MS/MS. Cependant, la présence d'une faible quantité de matière (1 mg par échantillon),

associée à une proportion substantielle de sels, a entraîné un affaiblissement notable du signal lors des analyses, nécessitant une étape de dessalage. Initialement, une tentative de dessalage en colonne a été entreprise (sur des sporophytes), cependant, les quantités de produits récupérées se sont avérées insuffisantes (0.1 mg par échantillon). En conséquence, une approche alternative a été adoptée, consistant à ajouter de l'eau distillée ultrapure aux échantillons, suivie de l'addition d'acétate d'éthyle. La phase organique (acétate d'éthyle) a ensuite été récupérée, séchée, puis re-suspendue à une concentration de 10 mg/ml dans du méthanol (MeOH). Les résultats ont été analysés en LC-MS/MS (**Chapitre II**). La phase aqueuse a été récupérée, séchée, puis soumise à une analyse en spectrométrie de masse, mais aucun composé n'a été détecté. Les échantillons issus de l'extraction par filtre en verre ont été traités de la même manière afin d'éliminer toute trace éventuelle de sel.

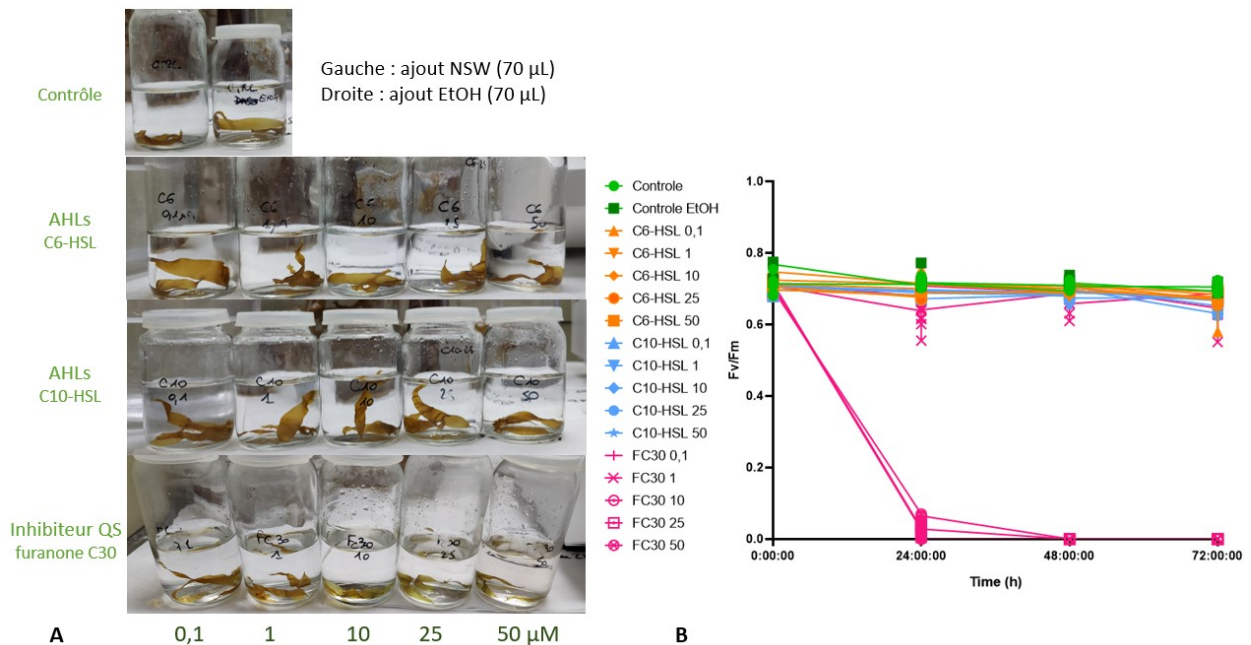
## 2. Expérimentation *in vitro* sur jeunes sporophytes de *Saccharina latissima*

### A. Mises en place de l'expérimentation

Afin d'évaluer le rôle des mécanismes du QS au sein de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*, de jeunes sporophytes ont été cultivés *in vitro* pendant une période d'environ 5 mois. Les sporophytes nécessaires à cette étude ont été fournis par l'équipe biologie des algues et interactions avec l'environnement du Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins (LBI2M) situé à Roscoff, France. Cette équipe maîtrise le cycle de reproduction de *Saccharina latissima*.

Les jeunes sporophytes de *Saccharina latissima* ont été exposés à des composés du QS, notamment les C6-HSL et les C10-HSL (activateurs) ainsi que les furanones C30 (inhibiteurs) (**Chapitre III**). Cependant, les concentrations d'exposition ont dû être préalablement déterminées. À cet effet, des sporophytes ont été placés dans des piluliers (3 par piluliers), auxquels ont été ajoutés les C6-HSL, C10-HSL et furanone C30 à des concentrations de 0,1, 1, 10, 25 et 50  $\mu\text{M}$  (**Figure A1.4A**). Le rendement maximal du photosystème II (Fv/Fm) a ensuite été mesuré à T0, T24, T48 et T72h, à l'aide d'un appareil JuniorPAM (Walz, Effeltrich, Allemagne). Les plantules ont été maintenues dans l'obscurité pendant 10 minutes avant chaque mesure. Il a été observé que la furanone C30 présente une

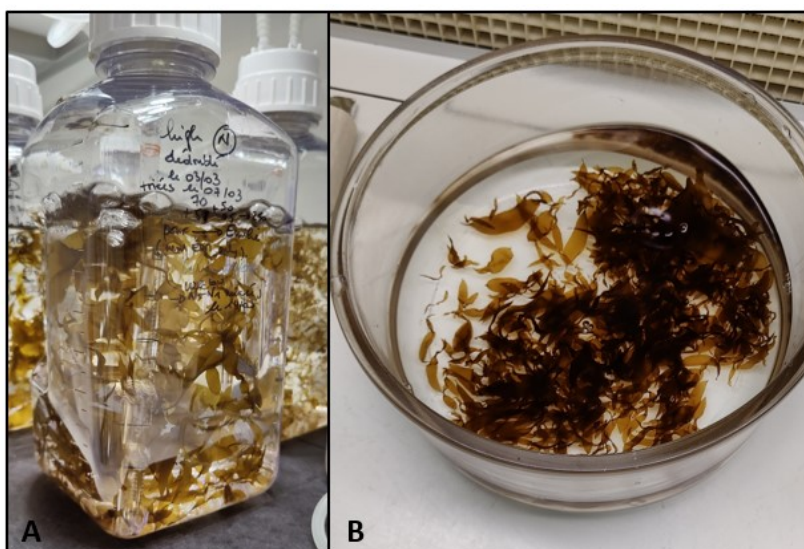
toxicité significative pour les sporophytes à partir d'une concentration de 10  $\mu\text{M}$ , entraînant la mort des sporophytes en quelques heures (**Figure A1.4B**). À une concentration de 1  $\mu\text{M}$ , la furanone n'a pas eu d'effet significatif sur le rapport Fv/Fm. Cependant, par mesure de précaution, cette concentration a été divisée par deux lors de l'expérimentation.



**Figure A1.4:** Test de concentrations des composés du QS ajoutés aux cultures de sporophytes (A) Exposition des sporophytes aux différents composés du QS (B) Résultats des mesures de photosynthèses au cours du temps. (FC30 correspond à la Furanone C30).

## B. Culture des algues en conditions contrôlées en présence de composés impliqués dans le QS

À partir de la culture mère de sporophytes, les algues ont été triées en fonction de leur taille, puis réparties de manière homogène dans des bouteilles, chacune contenant 750 ml d'eau de mer naturelle stérile (NSW) (**Figure A1.5**). Environ 18 sporophytes ont été placés en culture dans chaque bouteille pendant une période de 72 heures pour permettre leur acclimatation. Ensuite, ils ont été maintenus en culture pendant 7 jours après l'ajout des différents composés, à savoir l'eau de mer (NSW), l'éthanol (EtOH), les C6-HSL, les C10-HSL et la furanone C30 (FC30).



**Figure A1.5 :** Culture des sporophytes (A) Culture mère (B) Tri des sporophytes avant exposition aux composés impliqués dans le QS

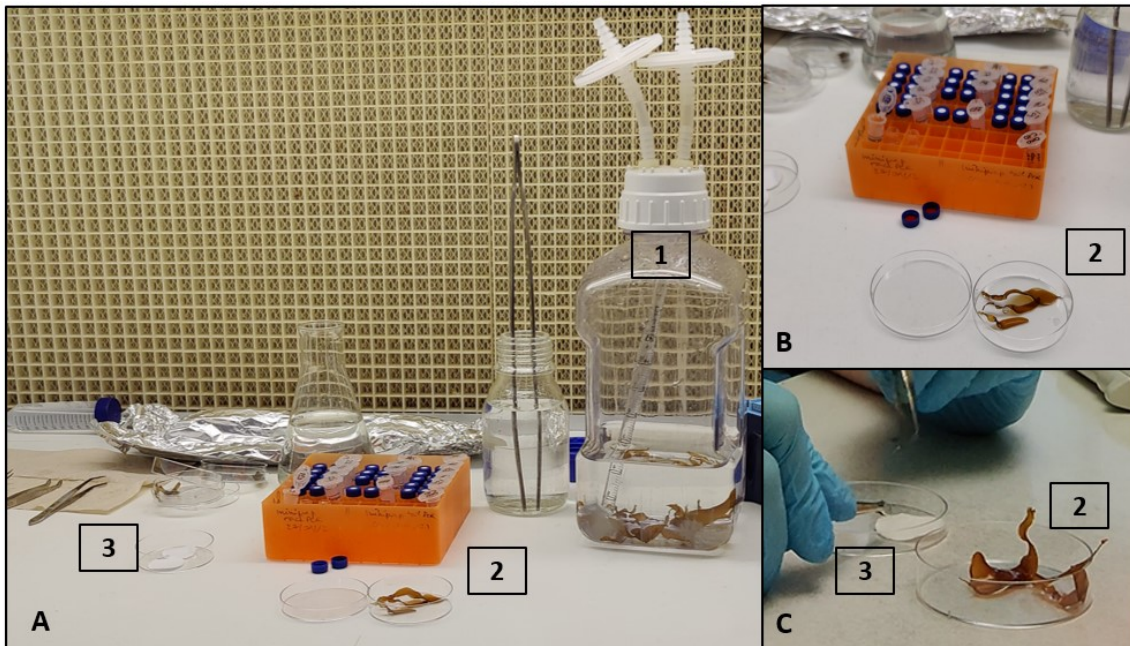
Cette expérimentation a été réalisée en quintuplicat, c'est-à-dire avec cinq bouteilles par condition expérimentale, à une température de 13,5°C, sous un régime lumineux de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. L'intensité lumineuse a été maintenue uniforme entre les bouteilles, avec une valeur de 5900 lux mesurée à une distance de 13,5 cm des bouteilles. Un système de bullage a été installé dans chaque bouteille, et une surveillance régulière de l'homogénéité du bullage a été effectuée (**Figure A1.6**). Il convient de noter que les composés ajoutés aux concentrations testées n'ont montré aucun effet toxique sur les sporophytes, et aucune bouteille n'a été exclue de l'expérience jusqu'à son terme.



**Figure A1.6:** Exposition *in vitro* des sporophytes de *Saccharina latissima* à des composés impliqués dans le QS

## C. Prélèvements au cours du temps

Comme précédemment exposé, la collecte de la diversité microbienne ainsi que des métabolomes à la surface des sporophytes ont été réalisés à l'aide de filtres en fibre de verre. Chaque filtre a été subdivisé en deux parties distinctes : l'une a été immergée dans de l'eau distillée en vue des analyses de métabarcoding, tandis que l'autre a été placée dans du méthanol (MeOH) pour les analyses métabolomiques. Préalablement à l'expérimentation, trois sporophytes (en quintuplicat) ont été prélevés à partir de la culture mère à T-72h (**Figure A1.5A**). Au cours de l'expérience, à des temps T0h, T24h, T48h, T72h et T7 jours, trois sporophytes ont été prélevés dans chaque bouteille et immédiatement soumis à une procédure d'échantillonnage en raclant leur surface (**Figure A1.7**). Les trois sporophytes prélevés ont été regroupés pour former un seul échantillon, ce qui a été effectué dans le but de maximiser le signal lors des analyses en spectrométrie de masse. Au bout de 24h et 7 jours, 50 ml d'eau de mer des bouteilles ont également été prélevés et congelés. Un contrôle a également été réalisé en utilisant des filtres en fibre de verre placés dans l'eau de mer stérile. Toutefois, en raison du grand nombre d'échantillons collectés (125 échantillons d'ADN et 125 métabolomes de surface), seules les conditions impliquant la C10-HSL, la furanone C30 et les témoins contenant de l'éthanol (EtOH) ont été analysés par métabarcoding de l'ARNr 16S, 18S et du fragment ITS. Les métabolomes et les 50 échantillons d'eau de mer à T24h et T7j (après extraction à l'acétate d'éthyle) ont tous été analysés par LC-MS/MS mais n'ont pour le moment pas été analysés.



**Figure A1.7:** Prélèvement au cours du temps de sporophytes de *Saccharina latissima* (A) Organisation de la paillasse (B) Zoom sur les sporophytes (C) Sporophytes au cours des prélèvements. Légende : (1) Bouteille de culture en condition contrôlée (2) Sporophytes (3) Filtres en fibre de verre

### 3. Études des microorganismes associés à l'épimicrobiote algal

#### A. Isolements et conservation des microorganismes

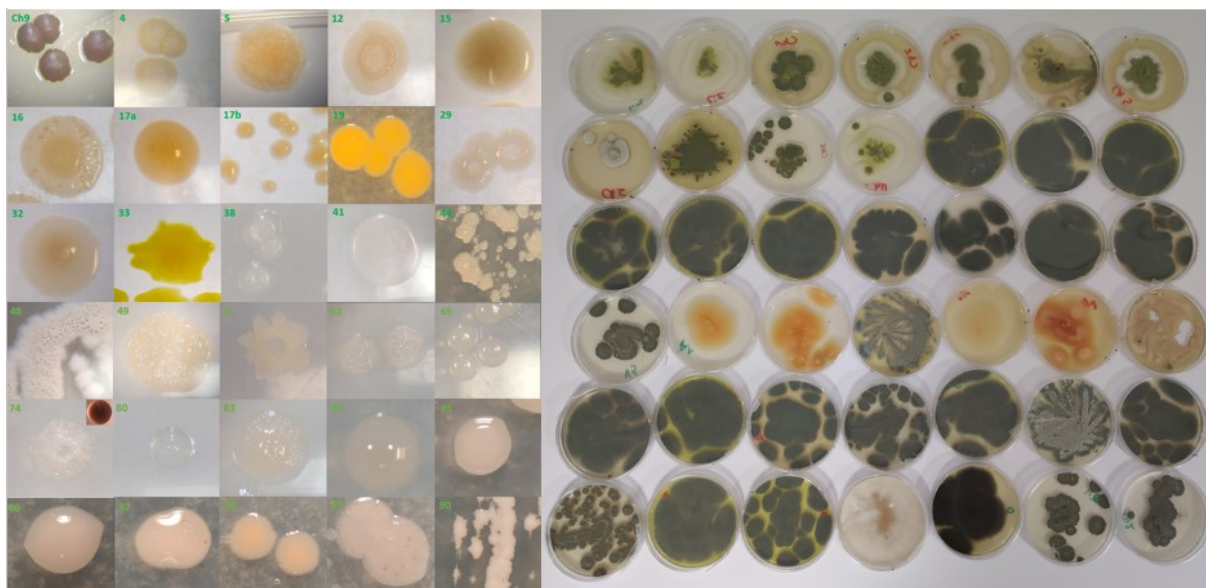
En parallèle, nous avons conduit une approche basée sur la culture pour caractériser les microorganismes présents à la surface de *S. latissima* à partir des échantillonnages 1 et 2. Le matériel et méthodes détaillé de l'isolement des microorganismes par dilution en série (Romani et al., 2019) figure dans le **Chapitre IV**.

Lors du premier échantillonnage (réalisé en janvier 2021), les milieux de culture d'isolement utilisés pour les souches bactériennes étaient le MA (Marine Agar, BD Difco), un milieu riche salin et le R2A (BD Difco) avec 100% d'eau de mer naturelle (NSW), un milieu de culture appauvri. En ce qui concerne les souches fongiques, le PDA contenant 75% de NSW (Potato Dextrose Agar, BD Difco) et le MEA contenant 75% de NSW ont été utilisés (Vallet et al., 2018). La composition de la MEA est la suivante : 20g d'extrait de malt (BD Difco), 20g de glucose (Sigma Aldrich), 1g de Bacto Peptone (BD Difco), 20g d'agar-agar (Sigma Aldrich) pour 1L de milieu. Lors du second échantillonnage (réalisé en juin 2021), dans le but d'isoler exclusivement des souches fongiques, les échantillons ont étéensemencés uniquement sur

du milieu MEA 75% et PDA 75%, tous deux contenant 1g/L de kanamycine (kanamycine sulfate de Streptomyces, Sigma Aldrich) et 1g/L de pénicilline G (benzylpénicilline, Sigma Aldrich). Les cultures ont été incubées à 18 °C dans l'obscurité (Henríquez et al., 2014; Li and Wang, 2009). Des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques ont également été isolées au cours de cette procédure.

Afin d'isoler les microorganismes présents, les cultures ont ensuite été maintenues à 18 °C dans l'obscurité jusqu'à ce que de nouvelles colonies cessent d'apparaître sur les boîtes de Petri. Chaque microorganisme a été ensuite transféré sur milieu MB pour les bactéries et sur milieu PDA pour les champignons. Les morphotypes distincts ont été isolés et repiqués de manière itérative jusqu'à l'obtention de cultures pures (Blanchet et al., 2017)(**Figure A1.8**). Toutes les souches microbiennes ont été conservées en triplicat à -80°C dans des cryotubes. Pour les bactéries, des milieux de cryoconservation composés de cultures liquides des souches en MB à 18°C avec 35% de glycérol ont été utilisés, tandis que pour les champignons, des morceaux de gélose ont étéensemencés dans des cryotubes avec 715 µL de PDA 75% NSW et 215 µL de 70% de glycérol.

Les souches bactériennes ont été cultivées sur des boîtes de Petri et ont été soumises à une analyse par séquençage du gène de l'ARNr 16S à Genoscreen (Lille, France) en vue de leur identification. Parmi les 280 souches envoyées, 272 ont été identifiées en blastant les séquences sur <https://www.ezbiocloud.net/> et NCBI. Les souches fongiques (42) ont été identifiées par le séquençage du fragment ITS1, effectué sur la plateforme Bio2Mar de l'Observatoire de Banyuls-sur-Mer (**Chapitre IV**). Parallèlement, les souches bactériennes isolées ont été soumises à des tests biochimiques pour évaluer leur capacité à produire et à inhiber les mécanismes du QS, ainsi qu'à former et à inhiber la formation de biofilm, en utilisant des tests au cristal violet. Les souches fongiques ont, quant à elles, été testées pour leur capacité à inhiber les mécanismes du QS et à inhiber la formation de biofilm bactérien.



**Figure A1.8:** Photo de quelques souches bactériennes et fongiques isolées de l'épimicrobiote de *Saccharina latissima*.

## B. Tests biochimiques et souches rapportrices (biosenseurs) utilisés pour la détection des composés impliqués dans le QS

Les tests biochimiques ont été effectués en utilisant des biosenseurs, qui sont des souches bactériennes génétiquement modifiées pour émettre un signal, soit lumineux soit colorimétrique, lorsqu'elles détectent un composé d'intérêt. Ces biosenseurs ont subi des modifications génétiques au niveau des gènes responsables de la production des composés de communication cellulaire quorum-sensing (QS), ce qui leur permet de détecter ces composés sans les produire eux-mêmes. Lors de la détection des composés du QS, ces biosenseurs émettent de la GFP (Green Fluorescent Protein), de la bioluminescence ou un pigment violet, selon le cas. Les biotests utilisés au cours de cette thèse, ainsi que leur spécificité, sont résumés dans le **Tableau A1.2**.

Biosenseur	CV026	MT102	F117	MM32
Nom complet	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Escherichia coli</i> (pJBA132)	<i>Pseudomonas putida</i> (pRK-C12; Kmr; ppul::npt)	<i>Vibrio harveyi</i> (luxN::Cm, luxS::Tn5Kan)
Types de composés détectés	AHLs			AI-2
Composés détectés	Chaines courtes (<C6)	Chaîne moyenne (C6 à C8)	Chaîne longue (>C8)	AI-2



Témoins positifs	C6-HSL	C6-HSL et Oxo-C10-HSL	Oxo-C10-HSL	DPD ou Surnageant MOLA292 / MOLA707
Témoins d'inhibition	MOLA116	MOLA116	MOLA116	ANT329
Antibiotiques	Gentamycine (20 µg.ml-1)	Tétracycline (25µg.ml-1)	Kanamycine (20µg.ml-1)	Kanamycine (50 µg.ml-1) et Chloramphénicol (10 µg.ml-1)
Température de croissance (°C)	25	37	30	25
Milieu de culture	LB	LB	LB	MB
Signal rapporteur	Violet	GFP	GFP	Luminescence
Sources	(McClellan et al., 1997)	(Riedel et al., 2001)	(Andersen et al., 2001)	(Bassler et al., 1993)

**Tableau A1.2:** Récapitulatif des biosenseurs utilisées pour détecter les composés impliqués dans les mécanismes du QS

Au cours des expérimentations, les biosenseurs ont été cultivés dans leurs conditions respectives, puis ils ont été inoculés dans des microplaques à 96 puits en présence de surnageant de culture bactérienne. Lorsque les biosenseurs détectent des composés impliqués dans les mécanismes du quorum-sensing (AHLs ou AI-2), ils émettent un signal lumineux qui peut être mesuré à l'aide d'un spectrofluorimètre. En revanche, lors du test d'inhibition des mécanismes du quorum-sensing, les biosenseurs sont cultivés en présence de composés du QS (AHLs ou AI-2), puis des surnageants de culture bactérienne ou des extraits fongiques leurs sont ajoutés. Lorsque les souches d'intérêt sont capables de produire des composés de dégradation ou d'interférer avec les composés du quorum-sensing, une diminution du signal lumineux est observée et mesurée. Les protocoles expérimentaux sont détaillés dans les **Chapitres IV et V** et sont des protocoles de routine de LBBM de Banyuls-sur-Mer (Blanchet et al., 2017; Romani et al., 2021; Tourneroché et al., 2019).

## C. Cultures des microorganismes et mesure de formation de biofilm bactérien

Les souches bactériennes isolées ont été cultivées en milieu MB à 18°C sous agitation (100 rpm) dans l'obscurité lors de toutes les expérimentations. Les surnageants bactériens utilisés pour les tests de détection des composés du QS ont été effectués à partir de cultures bactériennes à DO ~0.8, suivies d'une centrifugation de 15 min à 7000g pour séparer les cellules du milieu liquide. En ce qui concerne les tests d'inhibitions des composés impliqués dans les mécanismes du QS, les surnageants de cultures bactériennes ont été préparés à partir de culture ensemencée avec des C6-HSL ou des 3-oxo-C10-HSL en fonction du biotests effectués par la suite (le temps de croissance restant inchangé). Les cultures n'ont pas été ensemencées avec du DPD (précurseur d'AI-2) en raison de l'instabilité de ce composé.

Les cultures fongiques ont été réalisées dans des volumes de 50 ml de milieux liquides PDB (Potato Dextrose Broth) et MEA (Malt Extract Agar), chacun contenant 75% d'eau de mer naturelle (NSW). Les cultures ont été ensemencées avec des morceaux de gélose issus de cultures solides préalablement préparées (3 morceaux de gélose de 1 cm<sup>2</sup>) puis incubées sous agitation à 100 rpm, pendant 7 jours à une température de 18°C, dans l'obscurité. Dans un premier temps, les tests d'inhibition des composés du QS ont été réalisés sur les surnageants de culture fongique obtenus après une centrifugation de 30 minutes à 7000g, suivie d'une filtration à travers des filtres de 4 µm puis de 0.2 µm. Cependant, il a été constaté que les témoins MEA et PDA stériles se sont révélés particulièrement toxiques pour les biosenseurs (ces données n'ont pas été présentées). Par conséquent, une extraction à l'acétate d'éthyle a été réalisée à la fois sur les surnageants de culture et sur les milieux de culture. Les extraits ainsi obtenus se sont avérés non toxiques lors des tests d'inhibition des composés impliqués dans le quorum-sensing.

Pour évaluer la capacité de formation de biofilm, les souches bactériennes ont été cultivées dans des plaques de 48 puits pendant 5 jours. Par la suite, les microplaques ont été soigneusement rincées avec une solution tampon saline phosphate (PBS) puis séchées au four à une température de 60°C pendant 4 heures. Une coloration au cristal violet a été réalisée, suivie d'une révélation à l'aide d'acide acétique glacial, et la mesure de l'intensité de la coloration violette a été effectuée au spectrofluorimètre. La coloration du biofilm au cristal

violet est une technique simple et rapide qui permet de suivre l'évolution d'un biofilm. Le cristal violet se fixe sur des molécules contenant un ribose, telles que l'ADN ou la matrice du biofilm. Par conséquent, l'étape de rinçage des microplaques est d'une importance cruciale. La quantité de coloration est proportionnelle à la biomasse cellulaire, ce qui fait du rapport entre la coloration au cristal violet et la croissance cellulaire une méthode fiable pour quantifier le biofilm ou évaluer l'inhibition de sa formation par des composés d'intérêt. Le protocole détaillé du test de formation de biofilm, est présenté en détail dans le **Chapitre IV** de cette thèse (Romani et al., 2021).

#### **D. Tests d'inhibition de formation de biofilm bactérien**

Afin d'évaluer les capacités d'inhibition de la formation de biofilm par les surnageants bactériens et les extraits fongiques, un biotest a été mis en place. Deux souches bactériennes environnementales, *Vibrio harveyi* et *Labrenzia* sp., ayant la capacité de former du biofilm, ont été sélectionnées parmi la collection de microorganismes du LBBM.

*Vibrio harveyi*, un pathogène des huîtres *Crassostrea gigas* en Méditerranée, est capable de former du biofilm en MB entre 15°C et 30°C. Il est particulièrement résistant, son biofilm n'étant pas inhibé ni par la furanone C30 ni par la lactonase Aii20J, comme l'ont montré des données issues d'un projet antérieur. *Labrenzia* sp. 2184, une souche non pathogène isolée des rhizomes de *Posidonia oceanica*, forme également du biofilm. Son biofilm est inhibé par la lactonase Aii20J et par la furanone C30, bien que ces données n'aient pas été présentées dans cette étude. Ces deux souches ont été choisies pour illustrer la diversité des biofilms bactériens présents dans l'environnement. Au cours des expérimentations, les deux souches ont été inoculées dans des microplaques à 48 puits contenant du MB, et des surnageants bactériens ou des extraits fongiques ont été ajoutés. La formation de biofilm au bout de 48 heures a été mesurée en utilisant la méthode de marquage au cristal violet, comme expliqué précédemment. Les protocoles expérimentaux détaillés sont décrits dans les **Chapitres IV et Chapitre V** de cette thèse.

## 4. Isolement des composés d'intérêts

### A. Sélection des souches

L'objectif de la thèse est à terme d'isoler de nouveaux antifoulings ciblant les mécanismes du QS. Ainsi, à partir des biotests (tests biosenseurs et tests antibiofilms), nous avons sélectionné des souches fongiques capables d'inhiber les mécanismes du QS (AHLs et AI-2) et la synthèse de biofilm, sans aucune activité cytotoxique sur les souches rapportrices (**Chapitre IV**). Trois souches, d'origine fongique, se sont montrées particulièrement prometteuses en milieu MEA 75% NSW, il s'agit de *Penicillium chrysogenum* B5, *Penicillium atramentosum* V2 et *Acremonium fuci* A4.

### B. Culture en grand volume des souches fongiques et analyses du métabolome

Pour isoler les composés aux activités potentiellement antifoulings, une grande quantité d'extraits est nécessaire. Dans le but de maximiser le rendement et simplifier les expérimentations, différentes cultures ont été effectuées notamment en boîtes de Petri contenant du MEA 75% NSW, du MEA 100% eau distillée et en culture liquide contenant du MEA 75% NSW et MEA 100% eau distillée. Chaque culture a été extraite et chaque activité a de nouveau été testée, les résultats, non présentés dans cette thèse, ont mis en évidence que *P. atramentosum* V2 perd l'activité antibiofilm et anti-QS dès modification du milieu de culture (H<sub>2</sub>O ou boîte de Petri). En ce qui concerne *A. fuci* A4, son activité antifouling et anti-QS est présente uniquement en milieu salin (boîte de Petri ou culture liquide).

À partir de cultures solides en milieu MEA des deux souches d'intérêts, 12 erlens de 500 ml contenant 250 ml de MEA 75% NSW ont étéensemencés avec des morceaux de géloses (3 par erlens de 1 cm<sup>2</sup>). Les cultures ont été incubées sous agitation pendant 7 jours à 18°C dans l'obscurité (**Figure A1.9A et A1.9B**). Les cultures ont ensuite été filtrées puis extraites (voir Matériels et méthodes du **Chapitre V**). Différents extraits bruts ont été obtenus, un extrait solide de 720,24g et 1,5g d'acide gras (phase liquide) pour *P. atramentosum* V2 et 300,2 mg d'extrait brut sec pour *A. fuci* A4. En parallèle, une extraction du milieu MEA seul a été réalisée dans les mêmes conditions, afin de soustraire les composés, présents dans le milieu de culture, des résultats de l'extrait d'intérêt.

Les deux extraits ont été solubilisés à 10 mg.ml<sup>-1</sup> dans du MeOH puis analysés en spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Compte-tenu du faible rendement en biomasse d'*Acremonium fuci*, seul l'extrait de *P. atramentosum* V2 a été fractionné en vue d'une purification des composés (**Chapitre V**). Les résultats concernant les composés isolés de l'extrait solide de 720,24g de *Penicillium atramentosum* V2 figurent dans le **Chapitre V**. L'extrait de 1,5g est en cours d'analyse au MNHN.

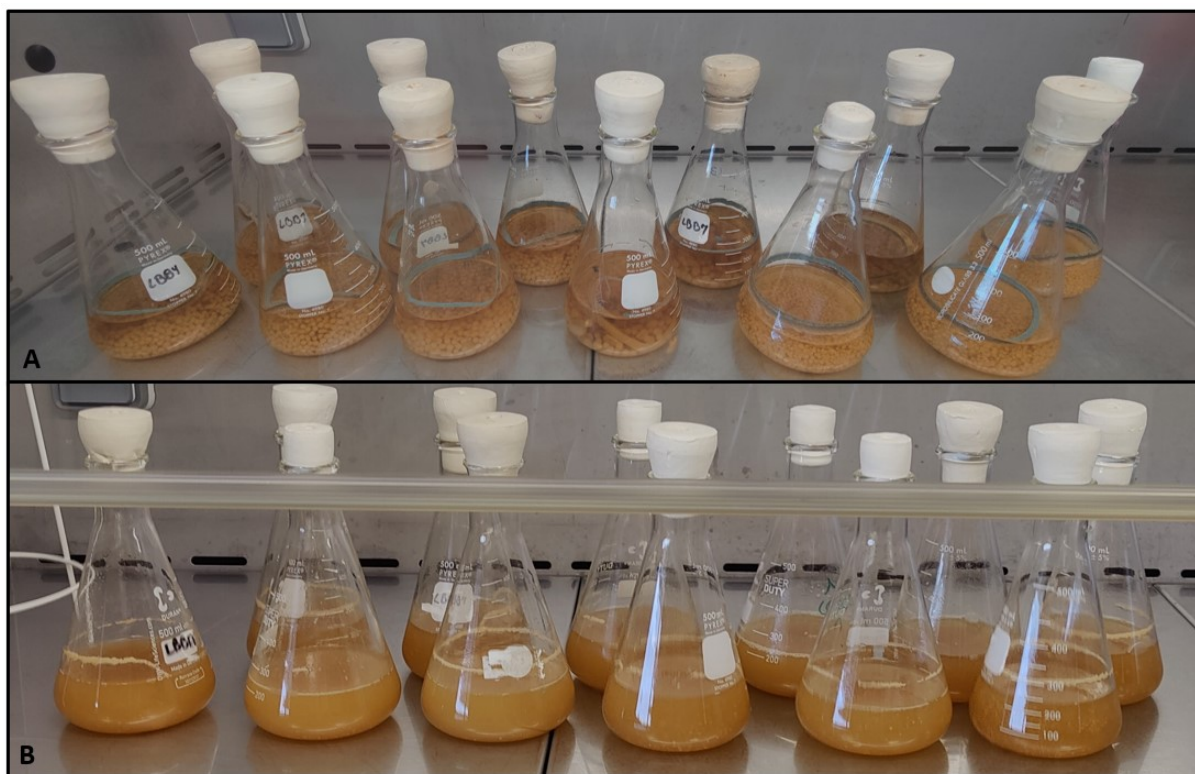


Figure A1.9: Culture de 3L de *Penicillium atramentosum* V2 (A) et *Acremonium fuci* A4 (B).

### C. Fractionnement et purification des composés par HPLC préparative

Le fractionnement et la purification de l'extrait de *P. atramentosum* V2 ont été réalisés au moyen d'une chromatographie liquide à haute performance préparative (HPLC préparative) supervisée par Séverine Amand, ingénieure d'études spécialisée en chimie des produits naturels (purification, détermination structurale, chimiothèque) de notre équipe.

L'HPLC préparative est une technique utilisée en chimie et en biochimie pour séparer, purifier et isoler des composés chimiques à partir d'un mélange complexe. Contrairement à la HPLC analytique, qui est principalement utilisée pour l'analyse quantitative, l'HPLC

préparative est axée sur l'obtention de quantités significatives de produits purs. En phase inverse (utilisée ici), les composés polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement, permettant ainsi de séparer et récolter les composés au cours du temps. Elles sont couplées à différents détecteurs qui mesurent le flux de sortie de solvant de la colonne et enregistrent les données au cours du temps. Ces détecteurs servent à la détection et à la quantification des composés séparés. Parmi les détecteurs les plus utilisés, les détecteurs UVs sont particulièrement sensibles et fournissent des informations sur l'absorbance des composés détectés mais ces signaux ne sont pas quantitatifs. Les HPLC-préparatives peuvent également être couplées à des ELSD (Evaporative Light Scattering Detectors) qui permettent la détection présentant une faible absorbance UV. Le principe de fonctionnement de l'ELSD repose sur la mesure de l'évaporation du solvant de l'éluant, ce qui entraîne la dispersion des composés sous forme de particules solides dans un flux de gaz. Ce flux de gaz est ensuite détecté par un faisceau de lumière laser. Lorsque la lumière est diffusée par les particules dispersées, elle est captée et mesurée pour générer un signal de détection proportionnel à la quantité de particules dispersées.

## **D. Caractérisation des composés par RMN**

Une fois les composés isolés et purifiés, ils ont été caractérisés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique d'analyse largement utilisée en chimie, en physique, et en médecine pour étudier la structure et la composition des atomes dans des échantillons.

La RMN repose sur les propriétés magnétiques des noyaux atomiques, qui sont constitués de protons et de neutrons, leur conférant une légère aimantation, appelée spin nucléaire, notamment sur des éléments tels que l'hydrogène et le carbone. À l'état naturel, cette aimantation est très faible, et les noyaux atomiques présentent des orientations aléatoires. Toutefois, lorsque ces noyaux atomiques sont placés dans un champ magnétique intense, ils acquièrent une aimantation nucléaire et s'orientent dans la direction de ce champ. Par le biais d'une fréquence de résonance spécifique, induite par l'application d'un champ magnétique oscillant, les spins nucléaires effectuent des transitions d'orientation en

absorbant ou en émettant de l'énergie, phénomène appelé résonance nucléaire. Un spectromètre de RMN se caractérise par la fréquence de résonance du noyau atomique étudié, le plus couramment l'hydrogène ( $^1\text{H}$ ) en raison de son abondance et de sa sensibilité élevée à la RMN puis vient le carbone ( $^{13}\text{C}$ ). Les protons, entourés de nuage d'électrons environnant, voient leur environnement chimique varier, ce qui entraîne de subtiles modifications dans la valeur du champ magnétique local, se traduisant par ce que l'on nomme un déplacement chimique. Ainsi, Le déplacement chimique constitue ainsi une mesure de la fréquence à laquelle un noyau atomique absorbe de l'énergie au sein d'un champ magnétique, et il est exprimé en parties par million (ppm) par rapport à une référence standard, qui est le tétraméthylsilane (TMS). Cette référence permet une normalisation précise et reproductible des données de déplacement chimique, essentielle pour l'interprétation des spectres de RMN et l'analyse structurale des composés chimiques.

Par ailleurs, l'analyse par RMN nécessite une étape préliminaire de solubilisation des extraits dans un solvant deutéré dont un ou plusieurs de leurs atomes d'hydrogènes sont remplacés par l'isotope stable du deutérium. Les spectres RMN ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker Avance III HD 400 MHz et 600 MHz (Wissembourg, France) équipés respectivement d'une sonde BBFO Plus Smart et d'une cryosonde TCI à triple résonance (CNRS-MNHN). L'analyse des spectres de RMN (**Chapitre V**) a été effectuée par Séverine Amand et Adrien Delorme, stagiaire de Master 1 en Sciences du médicament à l'Université de Saclay associés au projet encadré par Soizic Prado et moi-même.

# Annexes électroniques

Les figures et tableaux annexes associés aux articles du **chapitre II, III, IV et V** sont disponibles en version électronique. La liste des annexes électroniques figure ci-dessous.

## Annexes électroniques du Chapitre II

Les figures, figures supplémentaires et tableaux supplémentaires sont disponibles en version électronique. Les figures supplémentaires sont également présentes dans le manuscrit dans la partie **Annexes du Chapitre II**.

### Liste des figures : titres et légendes

**Figure II.1** Microbial diversity within *S. latissima* epimicrobiota determined by Illumina MiSeq-based high-throughput sequencing. **(A)** Bacterial diversity at the Class level **(B)** Bacterial diversity at the Family level **(C)** Eukaryotic diversity at the Class level **(D)** Eukaryotic diversity at the Family level **(E)** Fungal diversity at the Class level **(F)** Fungal diversity at the Class level. Epimicrobiota 1-6: epimicrobiota samples from *S. latissima* 1-6; SW1-SW4: seawater samples. Unassigned sequences are not shown (see **Supp. Figure II.1**)

**Figure II.2** Heatmap of core microbiota within *S. latissima* epimicrobiota **(A)** Bacterial core microbiota at the Family level **(B)** Bacterial core microbiota at the Genus level **(C)** Eukaryotic core microbiota at the Family level **(D)** Eukaryotic core microbiota at the Genus level

**Figure II.3** Metabolites within *S. latissima* epimicrobiota. Featured-Based Molecular Networking obtained on GNPS with parameters Min Pairs Cos=0.7 and Minimum Matched Fragment Ions=4

**Figure II.4** Abundance and prevalence of metabolites within *S. latissima* epimicrobiota. \*: Compounds with a MS/MS spectra

**Figure II.5** Multiple Factor Analysis (MFA) result: axis representation. **(A)** Contribution of each group to Dimension 1 **(B)** Contribution of each group to Dimension 2 **(C)** Partial axes plot colored by group



**Figure II.6** Multiple Factor Analysis (MFA) result: group of variables in each individual epimicrobiota (1-6) **(A)** Individuals plot factor map **(B)** Plot of quantitative variables colored by cos2

## Liste des figures et tableaux supplémentaires : titres et légendes

**Supp. Figure II.1** Methods for sampling the epimicrobiota of *Saccharina latissima*

**Supp. Figure II.2** Microbial diversity at the Family level with unassigned sequences in the epimicrobiota of *S. latissima* determined by Illumina MiSeq-based high-throughput sequencing. (A) Bacterial diversity (RNAr 16S gene) (B) Eukaryotic diversity (RNAr 18S gene) (C) Fungi diversity (ITS2 gene). Epimicrobiota 1-6: epimicrobiota samples from *S. latissima* 1-6; SW1-SW4: seawater samples.

**Supp. Figure II.3** Microbial diversity at the Genus level without unassigned sequences within the epimicrobiota of *S. latissima* (A) Bacterial diversity (RNAr 16S gene) (B) Eukaryotic diversity (RNAr 18S gene) (C) Fungi diversity (ITS2 gene). Epimicrobiota 1-6: epimicrobiota samples from *S. latissima* 1-6; SW1-SW4: seawater samples.

**Supp. Figure II.4** Alpha diversity index of Bacterial (A), Eukaryotic diversity (B) and Fungi Diversity (C) (Mann-Whitney test, GraphPad Prism 9.5.1).

**Supp. Figure II.5** Molecular network from FBMN without annotation

**Supp. Figure II.6** MFA construction dimension (A) Groups representation (B) Partial axes plot colored by group.

**Supp. Figure II.7** Contribution of top 150 quantitative variables to dimension (A) Dim-1 (B) Dim-

**Supp. Table II.1:** Composition within the epimicrobiota of *Saccharina latissima* (A) Bacterial ASV (B) Fungal ASV (C) Eukaryotic ASV. Epimicrobiota 1-6: epimicrobiota samples from *S. latissima* 1-6; SW1-SW4: seawater samples.

**Supp. Table II.2:** Putative annotation of the metabolites within the epimicrobiota of *S. latissima*.

**Supp. Table II.3:** MS and MS2 features of *Saccharina latissima* epimicrobiota samples and quantification for each sample. Data treated on MzMine 3.2.8.

**Supp. Table II.4:** Identification of clustering quantitative variables (coord > 0.8) for each dimension (A) Dim-1 (B) Dim-2.

## Annexes électroniques du chapitre III

Les figures et figures supplémentaires sont disponibles en version électronique. Le tableau supplémentaire, les figures supplémentaires et la partie matériels et méthodes supplémentaires de l'article sont également présents dans le manuscrit dans la partie **Annexes du Chapitre III**.

### Liste des figures : titres et légendes

**Figure III.1:** Bacterial diversity at Class and Family level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit).

**Figure III.2:** Fungal diversity at the Class and Family level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit).

**Figure III.3:** Eukaryotic diversity at the Class and Order level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit).

**Figure III.4:** Molecular network (FBMN) *Saccharina latissima* surface metabolomes without annotation. Green: Control EtOH, Blue: C10-HSL, Orange: Furanone C30

### Liste des figures et tableaux supplémentaires : titres et légendes

**Supp. Table III.1:** Primers used for sequencing.

**Supp. Figure III.1:** Testing the concentrations of QS compounds added to sporophyte cultures (A) Exposure of sporophytes to different QS compounds (B) Results of photosynthesis measurements over time (Fur corresponds to Furanone C30).

**Supp. Figure III.2:** Bacterial diversity at Family and Genus level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit).

**Supp. Figure III.3:** Alpha diversity index of Bacterial, Eukaryotic diversity and Fungi Diversity (Kruskal Wallis's tests, GraphPad Prism 9.5.1).

**Supp. Figure III.4:** Fungal diversity at Class and Family level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time with Laminariales sequences. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). (rRNA 16S dataset).

**Supp. Figure III.5:** Fungal diversity at Order and Genus level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). (ITS fragment dataset).

**Supp. Figure III.6:** Eukaryotic diversity at Class and Genus level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). (rRNA 18S dataset).

**Supp. Figure III.7:** Molecular network (FBMN) of *Saccharina latissima* surface metabolomes with m/z. Green: Control EtOH, Blue: C10-HSL, Orange: Furanone C30

## Annexes électroniques du chapitre IV

L'ensemble des figures, figures supplémentaires et tableaux supplémentaires sont disponibles en version électronique. Le matériels et méthodes supplémentaire de l'article est disponible dans l'**Annexes du Chapitre IV**.

### Liste des Figures : titres et légendes

**Figure IV.1:** Fungal and bacterial cultivable diversity from the epimicrobiota of *S. latissima*. (A) fungal diversity at the genus level of the 42 strains isolated (B) bacterial diversity at the genus level of the 272 strains isolated.

**Figure IV.2:** Metabolites putatively involved in microbial interactions produced by fungal strains isolated from the *S. latissima* epimicrobiota. Molecular subnetworks obtained after extraction of 100 metabolites potentially involved in interactions between microorganisms.

The complete network containing 573 metabolites is shown in Supp Figure 1 and annotations are shown in Supp Tables 3a and 3b.

**Figure IV.3:** Bioactivities of fungal strains in MEA and PDB media. Phylogenetic tree of fungal strains and biotest results for each strain in MEA and PDA culture media. The numbers on the branches correspond to the genetic distance between strains.

**Figure IV.4:** Bioactivities of bacterial strains in MB media. Phylogenetic tree of bacterial strains and biotest results for each strain in MB culture medium. The numbers on the branches correspond to the genetic distance between strains.

### Liste des figures et tableaux supplémentaires : titres et légendes

**Supp Figure IV.1:** Metabolomes of 42 isolated fungal strains in MEA and PBD media. Featured-Based Molecular-Networking (obtained on GNPS) with parameters Min Pairs Cos=0.7 and Minimum Matched Fragment Ions=4.

**Supp Table IV.1:** Identification of fungal strains.

**Supp Table IV.2:** Identification of bacterial strains.

**Supp Table IV.3:** Metabolites within the epimicrobiota of *S. latissima*. MS data after Mzmine 3.2.8 analysis (1442 features).

**Supp Table IV.4:** Putative annotation of fungal metabolomes.

**Supp Table IV.5:** Binary results of fungal biotests in MEA culture medium.

**Supp Table IV.6:** Binary results of fungal biotests in PDB culture medium.

**Supp Table IV.7:** Binary results of bacterial biotests in MB culture medium.

## Annexe électronique du chapitre V

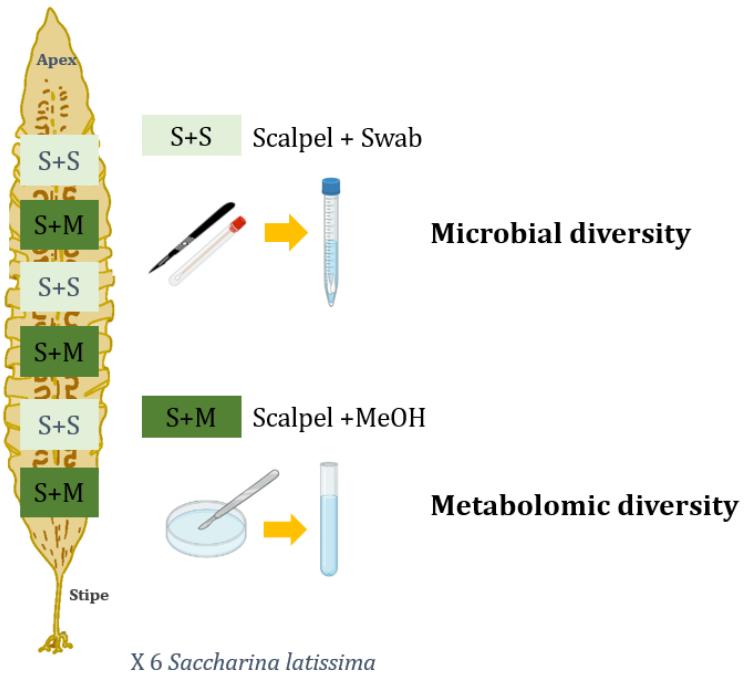
Le tableau supplémentaire V.1 figure en version électronique. Les figures supplémentaires correspondant aux spectres de RMN du Chapitre V se trouvent dans la partie **Annexes du Chapitre V**.

### Tableau supplémentaire : titre et légende

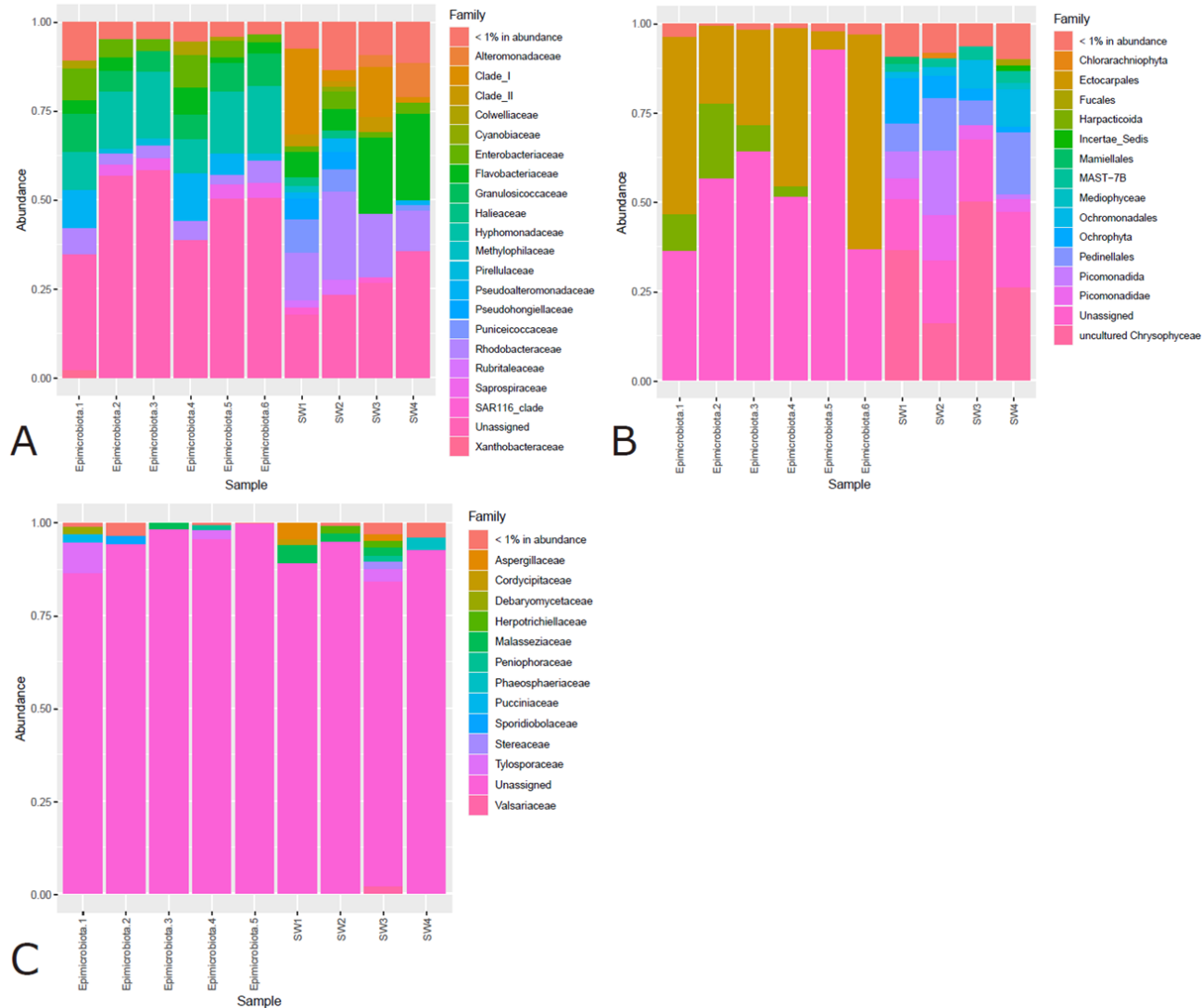
**Tableau Supp. V.1** : Putatives annotations des métabolites de *Penicillium atramentosum* V2

# Annexes du Chapitre II.

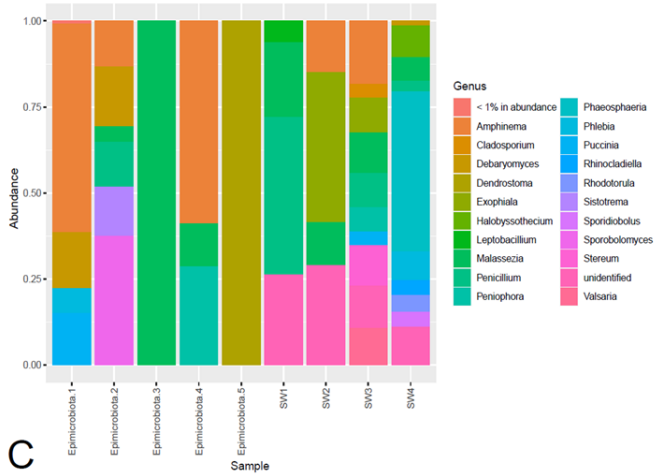
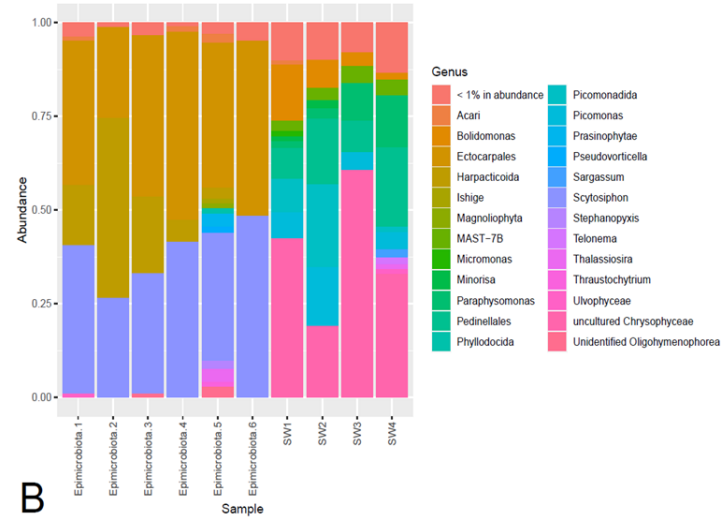
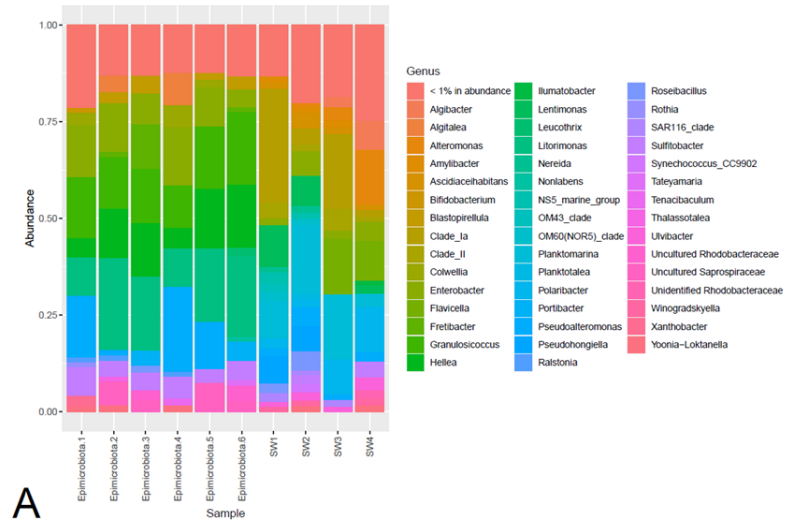
## Figures supplémentaires et légendes associées à l'article



**Supp. Figure II.1:** Methods for sampling the epimicrobiota of *Saccharina latissima*



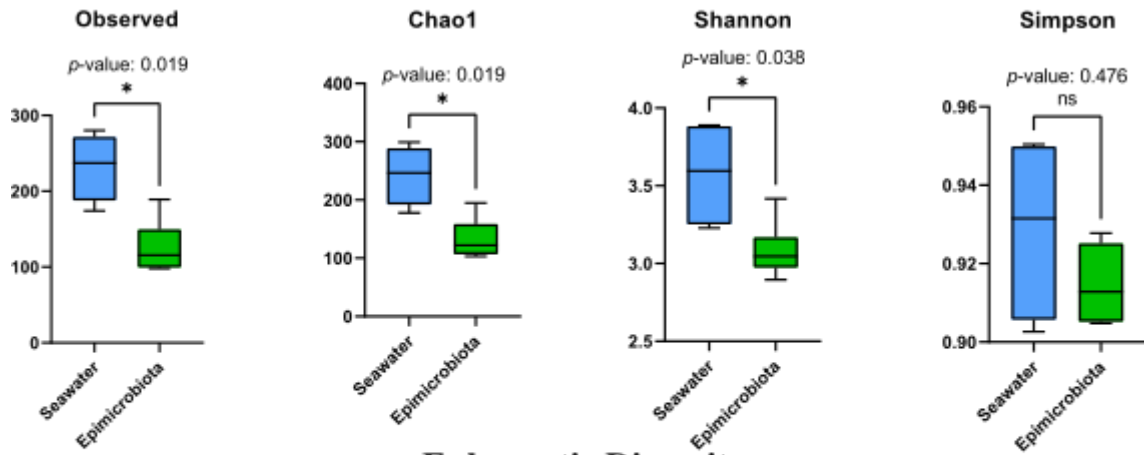
**Supp. Figure II.2:** Microbial diversity at the Family level with unassigned sequences in the epimicrobiota of *S. latissima* determined by Illumina MiSeq-based high-throughput sequencing. **(A)** Bacterial diversity (RNAr 16S gene) **(B)** Eukaryotic diversity (RNAr 18S gene) **(C)** Fungi diversity (ITS2 gene). Epimicrobiota 1-6: epimicrobiota samples from *S. latissima* 1-6; SW1-SW4: seawater samples. (Le panel C a été déplacé par rapport à la figure d'origine).



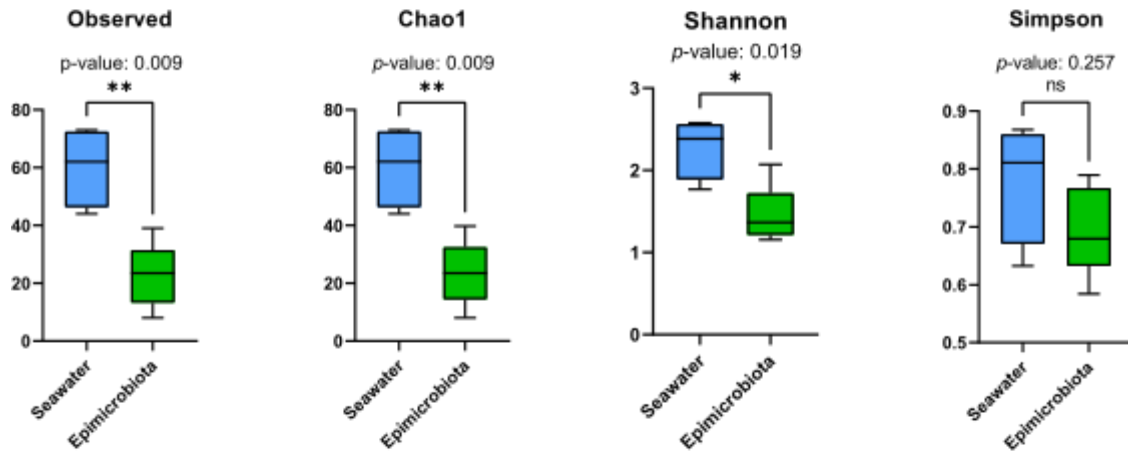
**Supp. Figure II.3:** Microbial diversity at the Genus level without unassigned sequences within the epimicrobiota of *S. latissima*. **(A)** Bacterial diversity (RNAr 16S gene) **(B)** Eukaryotic diversity (RNAr 18S gene) **(C)** Fungi diversity (ITS2 gene). Epimicrobiota 1-6: epimicrobiota samples from *S. latissima* 1-6; SW1-SW4: seawater samples. (Panel C déplacé par rapport à la figure d'origine de l'article)



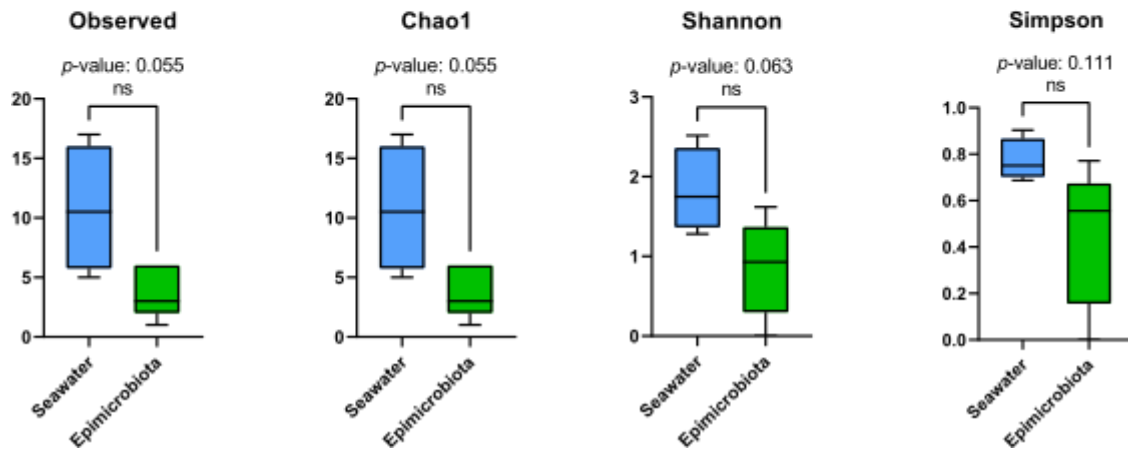
## Bacterial Diversity



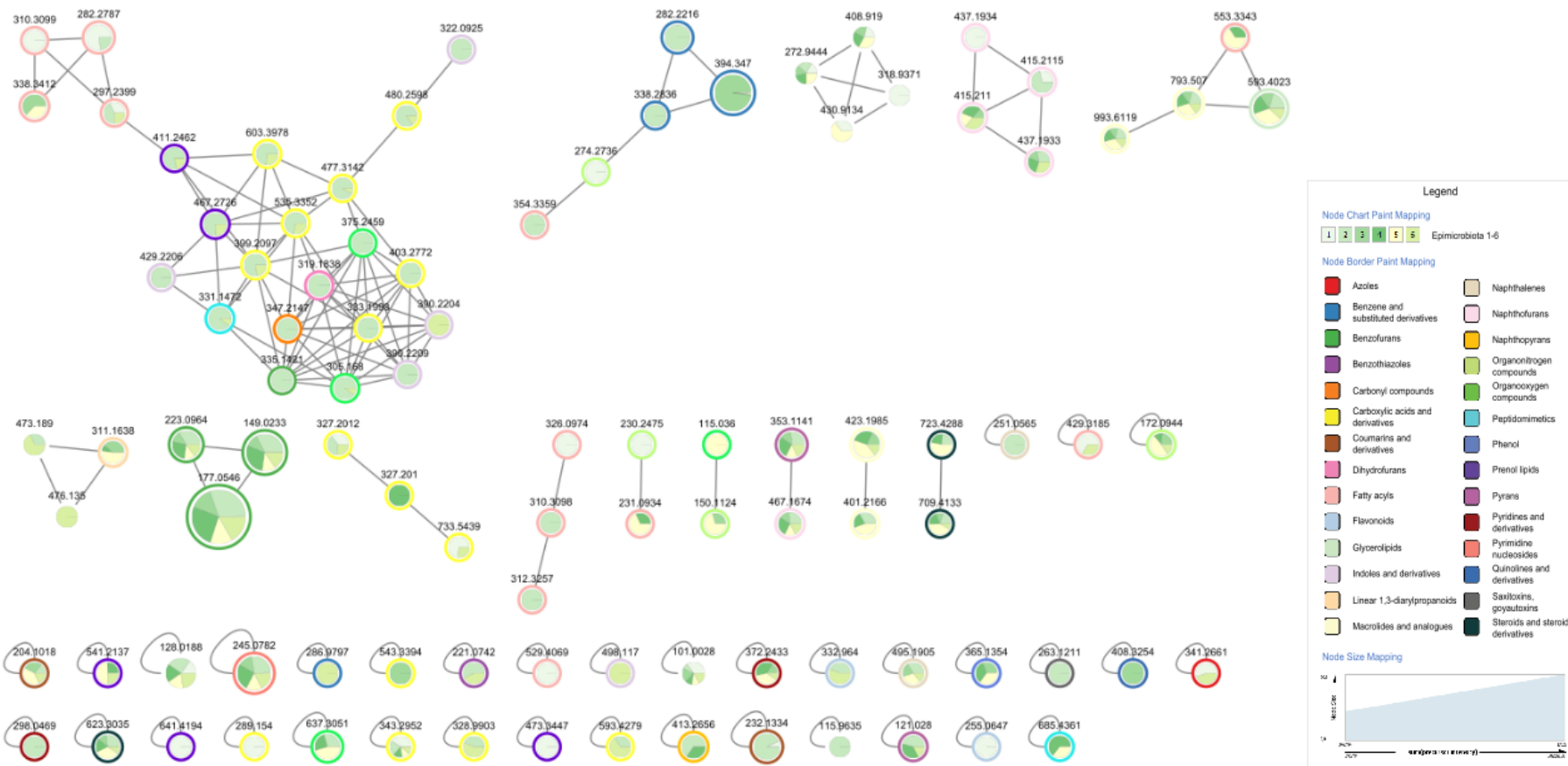
## Eukaryotic Diversity



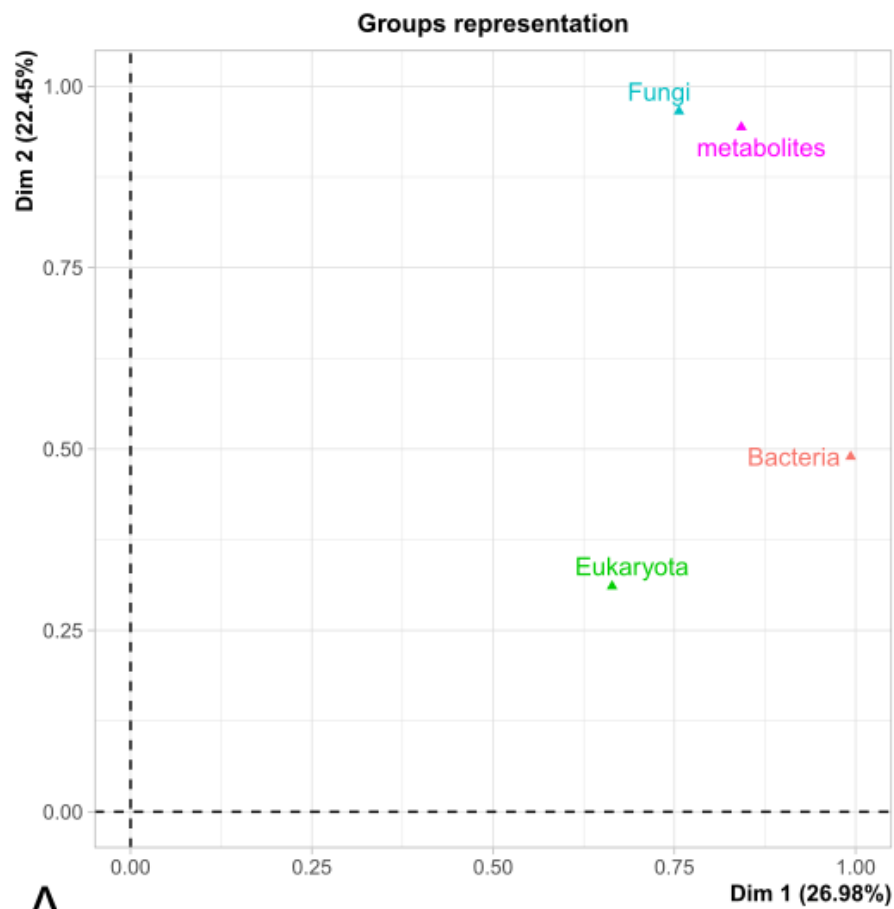
## Fungi Diversity



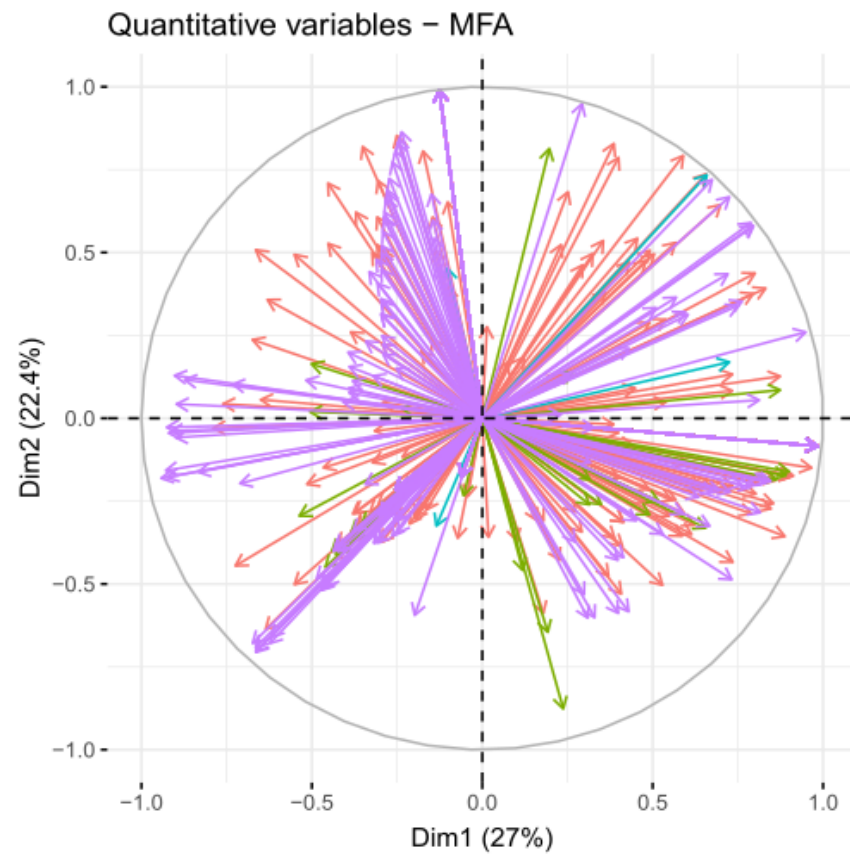
Supp. Figure II.4: Alpha diversity index of Bacterial (A), Eukaryotic diversity (B) and Fungi Diversity (C) (Mann-Whitney test, GraphPad Prism 9.5.1).



Supp. Figure II.5: Molecular network from FBMN without annotation



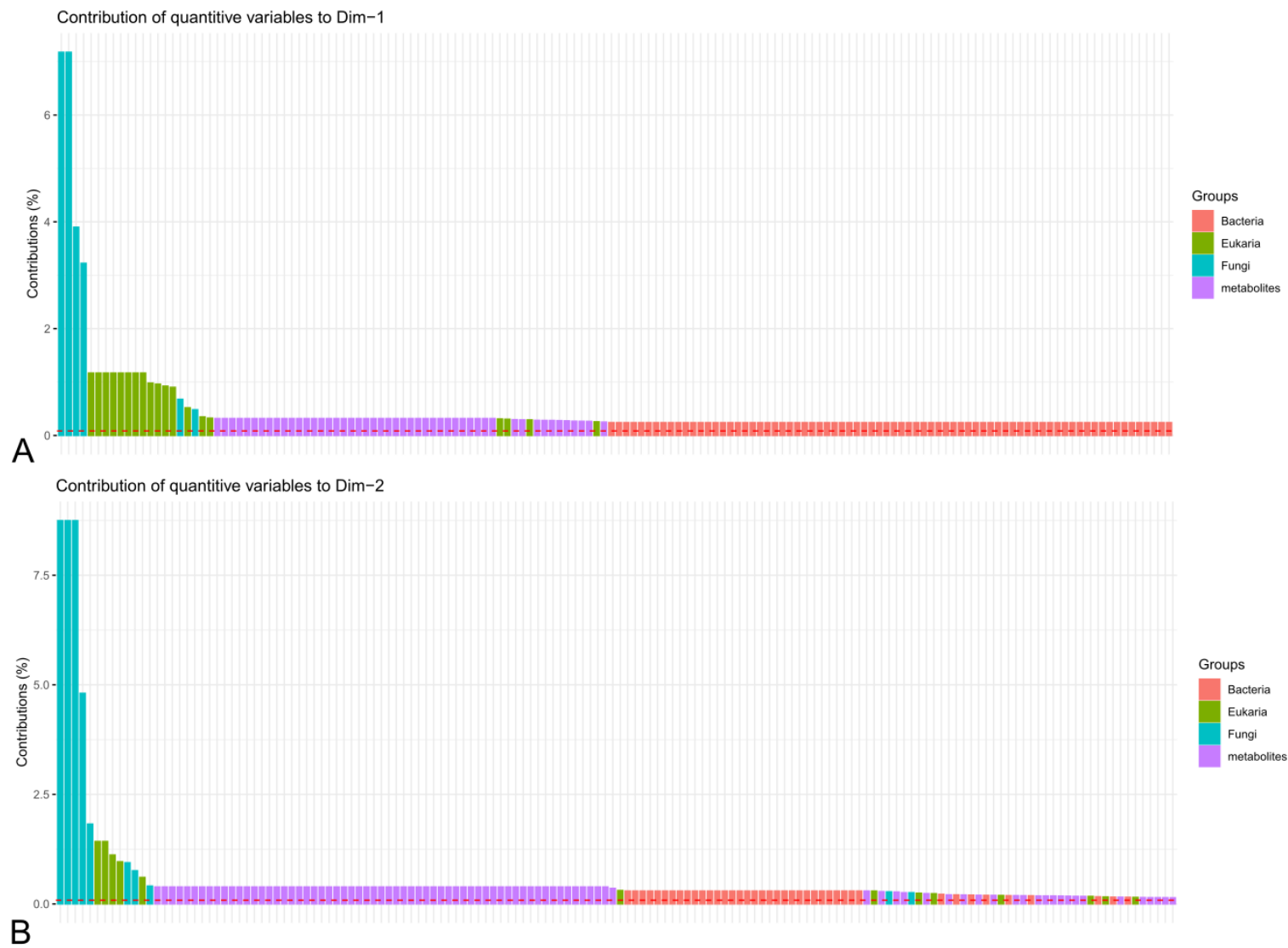
**A**



**B**

Groups → Bacteria → Eukaryota → Fungi → metabolites

**Supp. Figure II.6:** MFA construction dimension (A) Groups representation (B) Partial axes plot colored by group.



**Supp. Figure II.7:** Contribution of top 150 quantitative variables to dimension (A) Dim-1 (B) Dim-2

# Annexes du Chapitre III

## Supplemental information: Supp. Materials and Methods

### Bioinformatics processing of MinION sequencing results

Bioinformatic analysis was performed by Rosella Biosystem on the resulting pod5 files. Basecalling was performed using the Dorado v0.3.3 (<https://github.com/nanoporetech/dorado/>) in simplex super accurate mode using model v4.2.0 and default parameters. The obtained fastq files were filtered for read length using Seqkit v2.1.0 (Shen et al., 2016) keeping discarding reads below 500bp and above 2000bp. Subsequently, the deconvolution of the 16S, 18S and ITS amplicons was performed for each sample. The sequence of the forward and reverse primers was searched for using seqkit. Specifically, for each primer, all theoretically possible variants were generated using custom scripts with all combinations at ambiguous bases covered. The sequence of the obtained patterns was searched for in reads with up to 2 mismatches allowed (seqkit locate -m 2). Each read was assigned to the gene, e.g. 16S, 18S or ITS, with the greater number of matches. When no match was found or two or more genes had an equal number of matches, the read was considered unclassified and removed from downstream analysis. A single fastq file for each gene of 16S, 18S and ITS was obtained for each sample.

Subsequently, taxonomic assignment of reads was performed using Kraken2 v2.1.2 (Wood et al., 2019). Five kraken2 databases were used. *Silva* v138.1 (Quast et al., 2013) and *Greengenes* version of 03.06.2017; (DeSantis et al., 2006) were built using "special" mode in Kraken2-build. Dairydb v1.2.4 (Meola et al., 2019) was obtained from <https://github.com/marcomeola/DAIRYdb/>. NCBI-prokaryota was built from bacterial and archeal 16S collections downloaded (15.05.2022; (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/TargetedLoci/Bacteria/bacteria.16SrRNA.fna.gz> and <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/TargetedLoci/Archaea/archaea.16SrRNA.fna.gz>).

For NCBI-eukaryota, sequences were downloaded using the search function of NCBI Entrez (<https://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/>) for the following taxa as "Organisms" (Rhodelphea; Amoebozoa; Ancyromonadida; Apusozoa; Breviatea; Opisthokonta; CRuMs;

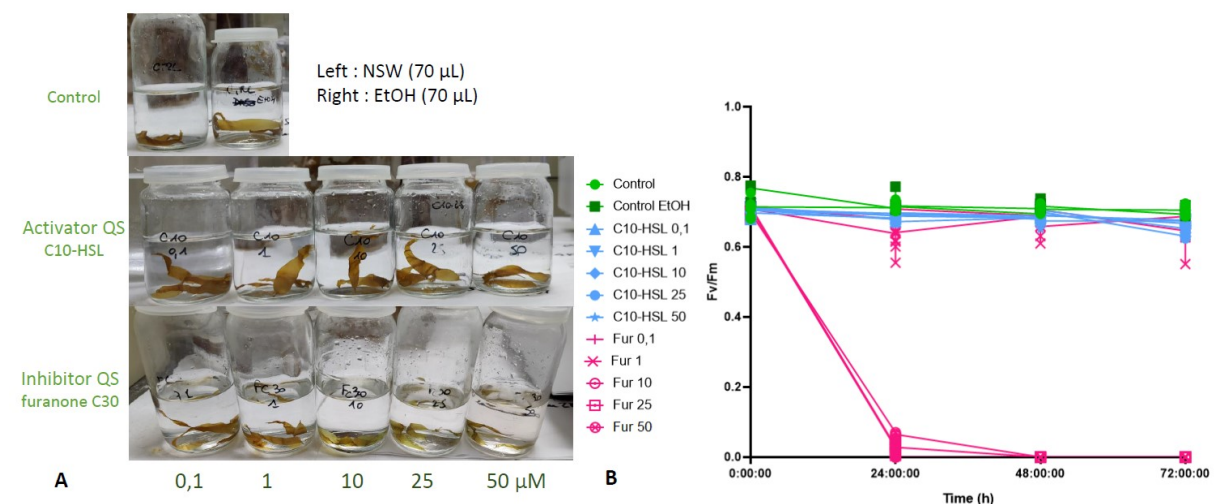
Rhodophyta; Viridiplantae; Glaucocystophyceae; Sar; Haptista; Provora; Cryptophyceae; Discoba; Metamonada; Malawimonadida; Hemimastigophora) with one or more of the following keywords ("18S", "internal transcribed spacer", "small subunit ribosomal") and filtered for sequences under 30kb. Sequences from "Uncultured fungus" as Primary organism were removed.

16S reads were assigned against *Silva* with only 16S reads assigned to Bacteria was selected for downstream analysis. 18S and ITS reads were assigned against *NCBI-eukaryota* with ITS and 18S reads assigned to Eukaryota were selected for downstream analysis

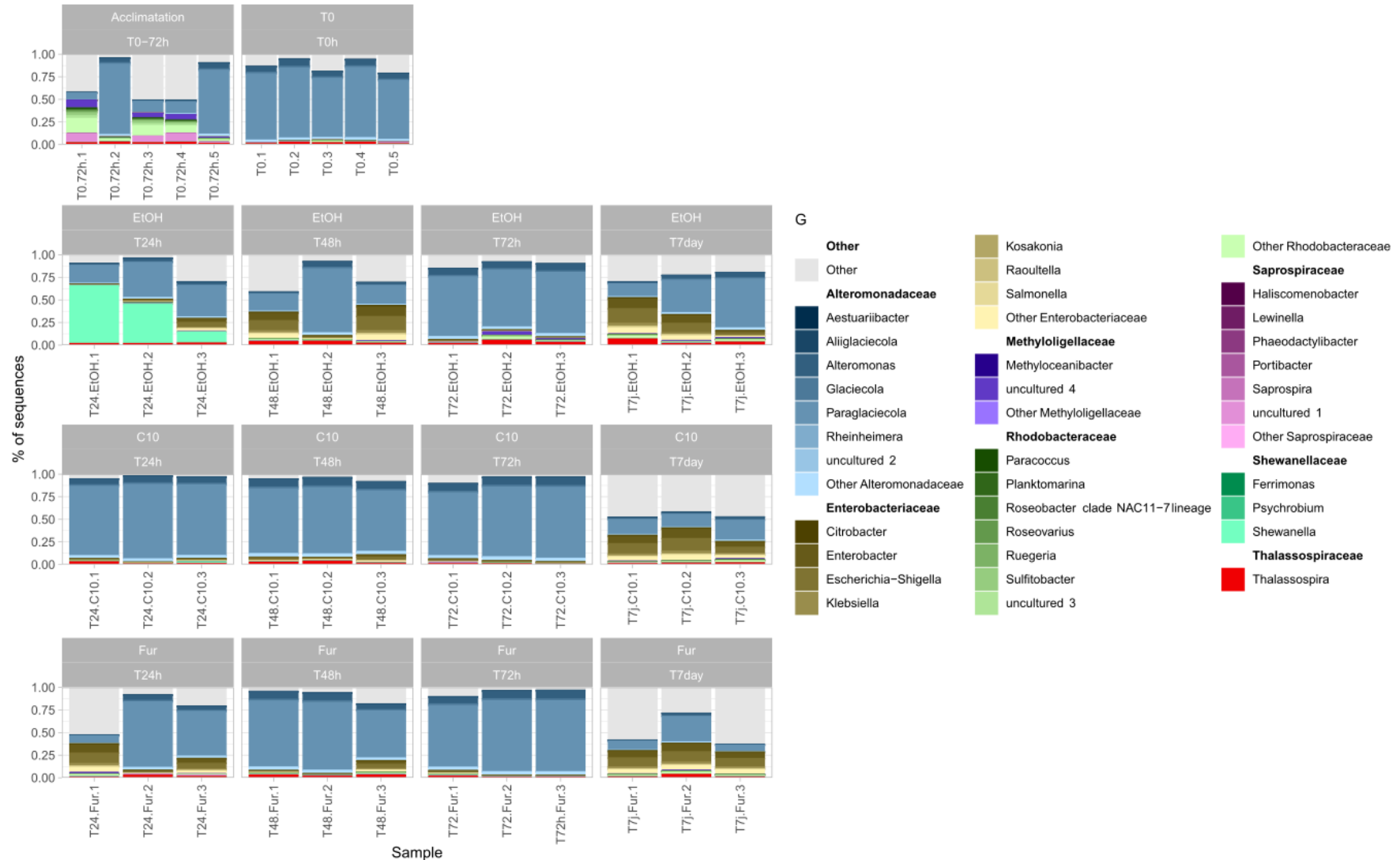
### Supplementary figures and legends

Target	Name	Forward	Name	Reverse
16S rRNA gene	341F	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'	1391R	5'-GACGGGCGGTGWGTRCA-3'
	391F	5'-YGGAGARGGAGCHTGAGA-3'	1626R	5'-GACRGGMGGTGTGBACAA-3'
ITS fragment	ITS-u1	5'-GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG-3'	ITS-u4	5'-RGTTCCTTTCTCCGCTTA-3'

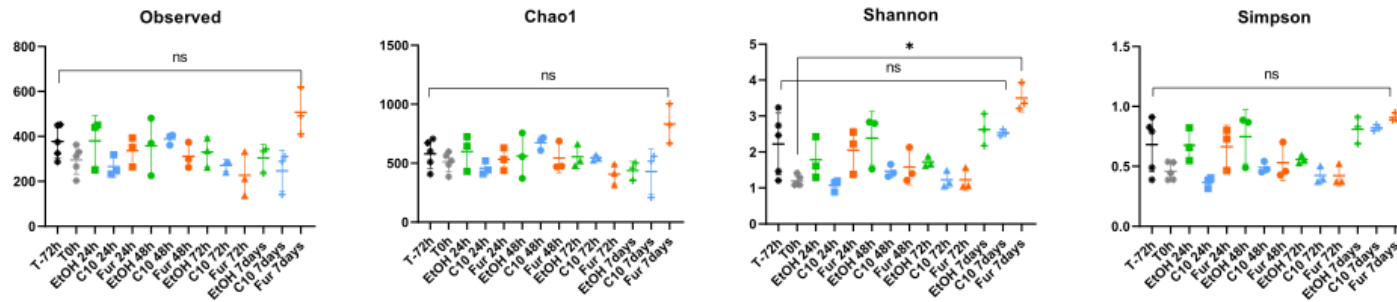
Supp. Tableau III.1 : Primers used for sequencing



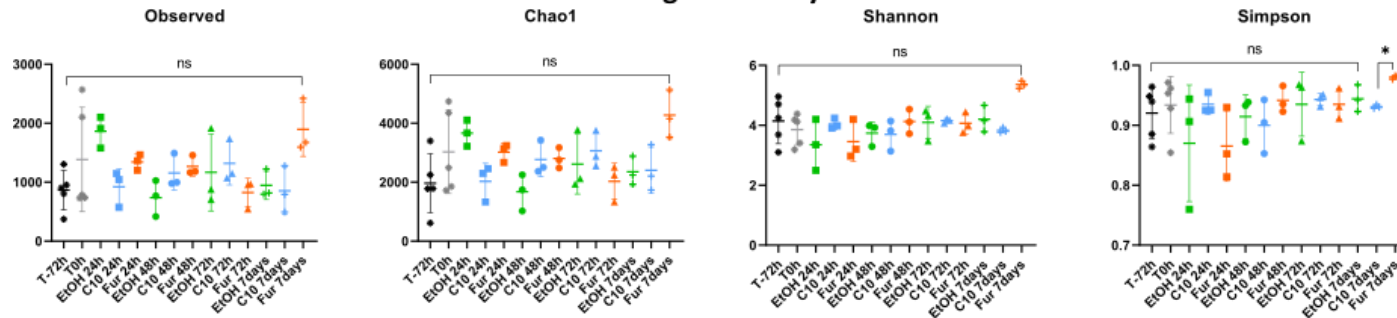
Supp. Figure III.1: Testing the concentrations of QS compounds added to sporophyte cultures(A) Exposure of sporophytes to different QS compounds (B) Results of photosynthesis measurements over time (Fur corresponds to Furanone C30).



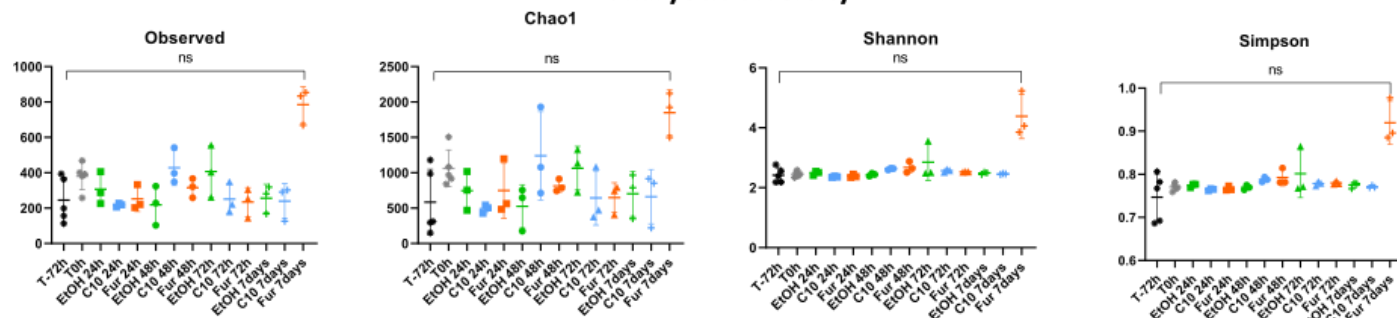
### Bacterial diversity



### Fungal diversity

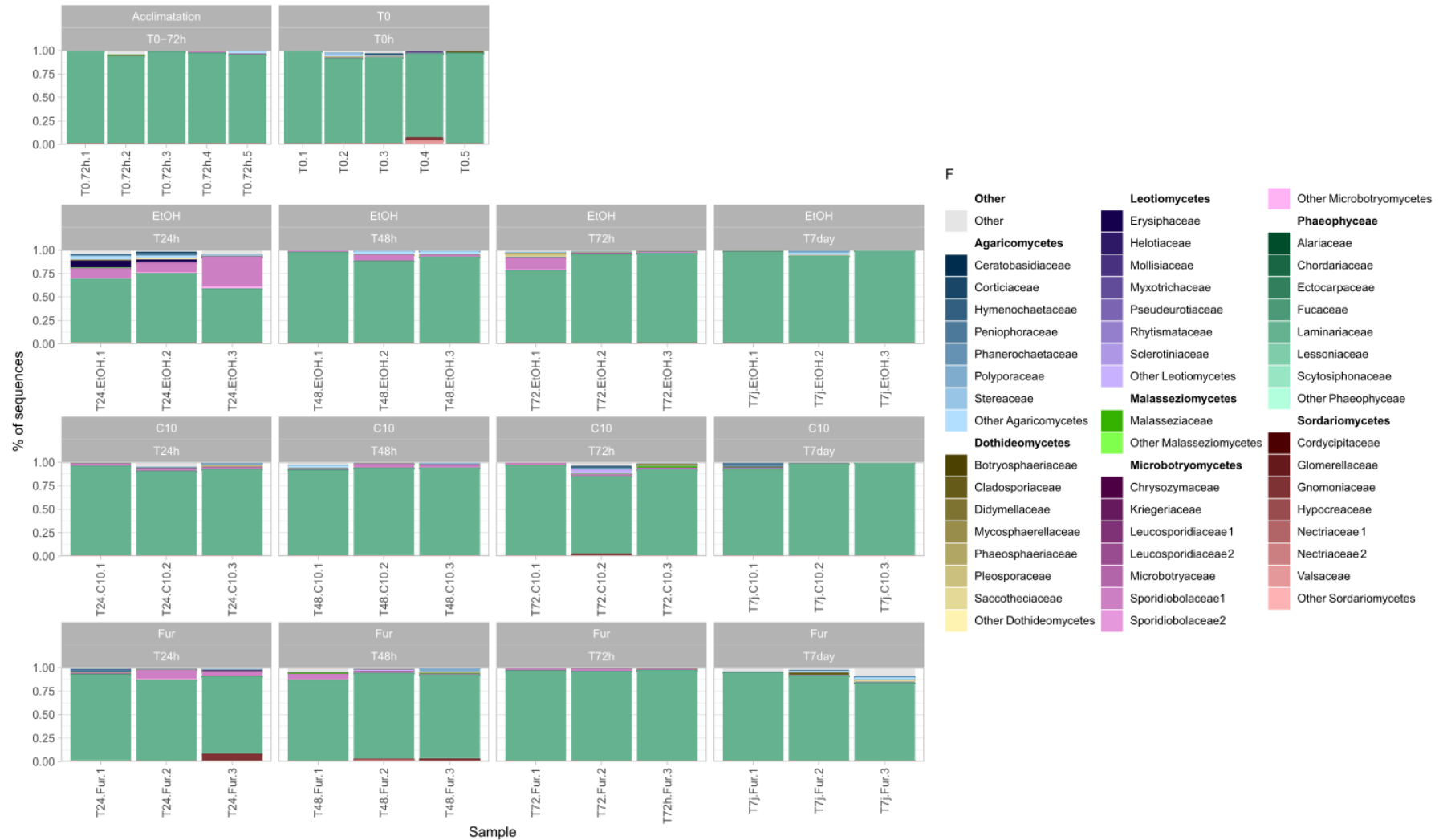


### Eukaryotic diversity

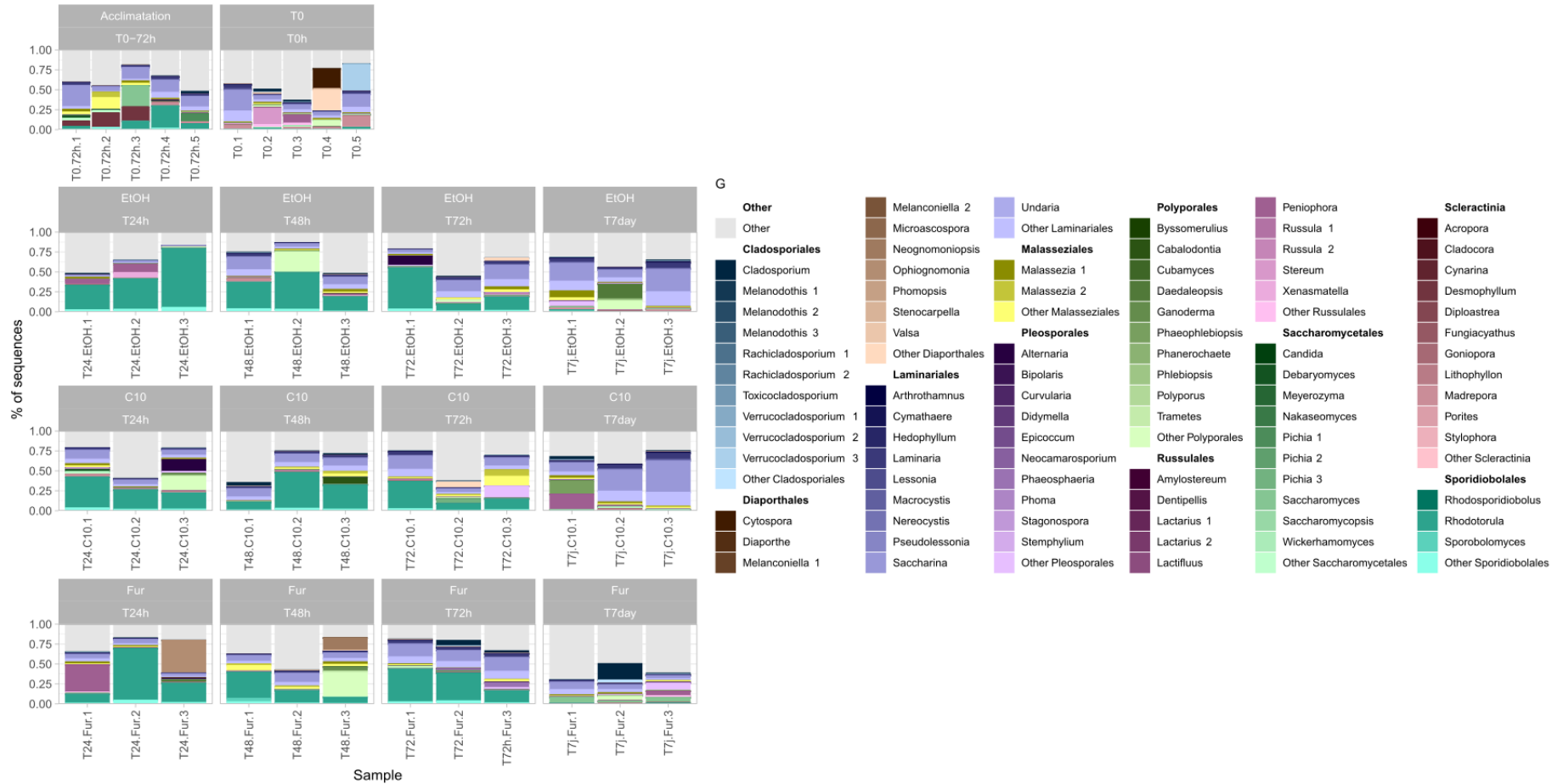


Supp. Figure III.3: Alpha diversity index of Bacterial, Eukaryotic diversity and Fungi Diversity (Kruskal Wallis's tests, GraphPad Prism 9.5.1).

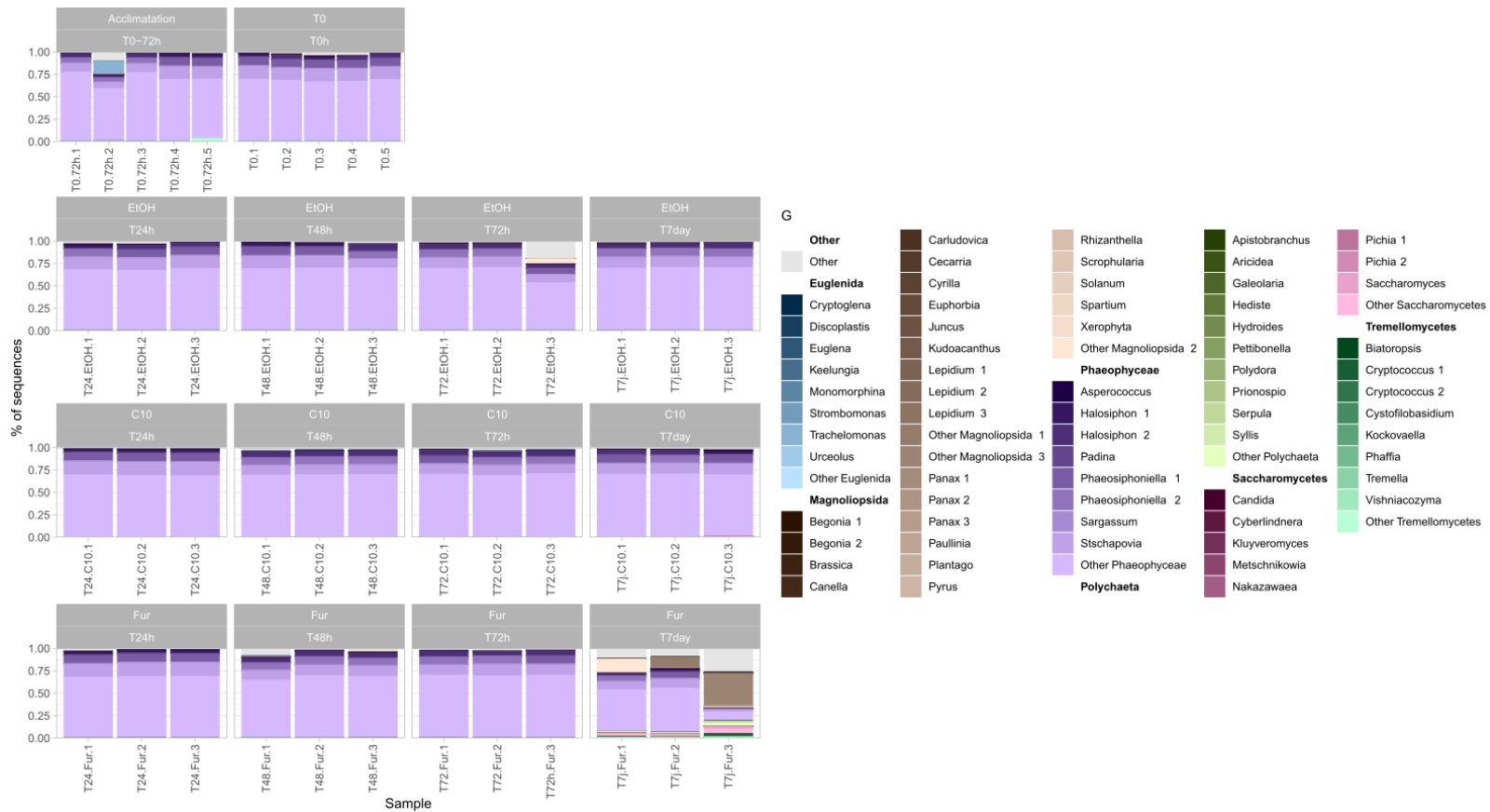




**Supp. Figure III.4 :** Fungal diversity at Class and Family level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time with Laminariales sequences. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). (rRNA 16S dataset).



**Supp. Figure III.5:** Fungal diversity at Order and Genus level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). (ITS fragment dataset).



**Supp. Figure III.6** : Eukaryotic diversity at Class and Genus level within *Saccharina latissima* epimicrobiota exposed to QS compounds over time. Legend: EtOH for ethanol addition (control), C10 for C10-HSL (activator QS circuit), Fur for furanone C30 (inhibitors QS circuit). (rRNA 18S dataset).

# Annexes du Chapitre IV

## Supplemental information: Supp. Materials and Methods

### Quorum sensing bioassay: detection of AI-1 production

To detect AI-1, the biosensors *Pseudomonas putida* F117 (pRK-C12; Kmr; ppul::npt) and *Escherichia coli* MT102 (pJBA132) were used for long acyl chain AHLs (>8 carbons in the acyl side chain) and medium-chain AHLs ( $\leq 8$  carbons in the acyl side chain), respectively (Andersen et al., 2001; Riedel et al., 2001). For the detection of short-chains (from C4-HSL to C8-HSL), *Chromobacterium violaceum* CV026 was used in liquid media (McClellan et al., 1997). Briefly, the biosensors F117, MT102, and CV026 were precultured in Luria Bertani (LB) medium at 37 °C, 30 °C, and 25 °C, respectively, for 24 hours. In 96-well microplates, 50  $\mu$ L of bacterial supernatant was added to 150  $\mu$ L of triplicate biosensor culture (diluted 1/50 in growth media) and incubated for 24 hours at the corresponding preculture temperature.

For fungal extract bioassays, 20  $\mu$ L of 1 mg/ml extract (dissolved in 10% DMSO) was added to 180  $\mu$ L of biosensors. After 24 hours, the cell growth (OD<sub>630nm</sub>) and GFP fluorescence (OD<sub>535nm</sub>) of F117 and MT102 were measured using a Victor 3 spectrofluorometer (Perkin Elmer). For the CV026 biosensor, the production of violacein was directly observed after 24 hours. Two negative controls were used for all tests: (i) sterile marine broth media alone and (ii) biosensor supplemented with culture medium or fungal culture medium extract diluted in 10% DMSO. The positive controls for biosensors F117, MT102, and CV026 were two commercial AHLs (C6-HSL and 3-oxo-C10-HSL at 10  $\mu$ M, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) diluted in culture medium supplemented with 10% DMSO.

### Quorum sensing bioassay: detection of inhibition of AI-1

To measure AI-1 inhibition by culture supernatants or extracts, the biosensor cultures were supplemented with 3  $\mu$ M AHLs, 3-oxo-C10-HSL was added for F117 and MT102 and C6-HSL for CV026 and MT102, which can detect the inhibition of both types of AHLs. In the microplate, 150  $\mu$ L (for bacterial test) or 180  $\mu$ L (for fungal test) of biosensors (diluted at 1/50 in growth media) supplemented with AHLs were added, followed by 50  $\mu$ L of bacterial culture

supernatants or 20  $\mu\text{L}$  of 1 mg/ml fungal extract (dissolved in 10% DMSO). The microplates were incubated, and after 24 h, the same measurements as described before were performed. However, the inhibition of the biosensor signal was calculated to determine the percentage of AI-1 inhibition. Two negative controls were used for the tests: (i) biosensors without AHLs with the addition of culture medium or culture medium extract diluted in 10% DMSO and (ii) biosensors with AHLs and the addition of sterile culture medium or culture medium extract diluted in 10% DMSO.

### **Quorum sensing bioassay: detection of production of AI-2**

*Vibrio harveyi* (luxN::Cm, luxS::Tn5Kan), also designated MM32, was used to detect the presence of AI-2 in the culture supernatants (Bassler et al., 1993; Freeman and Bassler, 1999; Tournerocche et al., 2019). The *V. harveyi* MM32 reporter strain was grown at 30 °C in marine broth medium supplemented with kanamycin (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and chloramphenicol (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). In a 96-well plate, 180  $\mu\text{L}$  of biosensor (diluted at 1/100 in growth media) was added to wells containing 20  $\mu\text{L}$  of microbial strain supernatants (in triplicate) for AI-2 production testing. After 24 hours at 30 °C, cell growth ( $\text{OD}_{630\text{nm}}$ ) and luminescence ( $\text{OD}_{540\text{nm}}$ ) of MM32 were measured using a Victor 3 spectrofluorometer (Pelkin Elmer®). All tests were performed with two negative controls: (i) sterile MB alone and (ii) biosensor supplemented with supernatant culture medium. The positive control was a culture supernatant from strain BBCC292 (MOLA292), known to be a strong AI-2 producer (Blanchet et al., 2017).

### **Quorum sensing bioassay: detection of inhibition of AI-2**

For the detection of AI-2 inhibition, a *Vibrio harveyi* MM32 biosensor was used in the presence of 1  $\mu\text{M}$  DPD (precursor of AI-2, from Rita Ventura's research Group at ITQB, Oeiras, Portugal)(Ascenso et al., 2011). In a microplate, 20  $\mu\text{L}$  of culture supernatant or fungal extract was added to 180  $\mu\text{L}$  of biosensor (diluted at 1/100 in growth media) and DPD. The negative controls were (i) biosensor without DPD and (ii) biosensor with DPD with the addition of the culture medium of the tested supernatants or the culture medium of the extracts. The positive control used was the active extract of the fungal strain *Microsphaeropsis olivacea* AN329T dissolved in DMSO 10%, as highlighted in (Tournerocche et al., 2019).

## Processing of results, statistical analyses, and graphic representations

A first processing of the data was performed, and an average of triplicates for each strain and extract was obtained at the end of each treatment. To assess biofilm formation for each strain relative to its growth, the ratio  $dOD_{540nm}/dOD_{620nm}$  was calculated with violet staining; on the one hand,  $dOD_{540nm} = OD_{s\ 540nm} - OD_{m\ 540nm}$ , i.e., the difference between the staining of the strain of interest ( $OD_{s\ 540nm}$ ) and the culture medium control ( $OD_{m\ 540nm}$ ); and on the other hand, the growth  $dOD_{620nm} = OD_{s\ 620nm} - OD_{m\ 620nm}$  with the difference in opacity/growth between the strain of interest ( $OD_{s\ 620nm}$ ) and the culture medium ( $OD_{m\ 620nm}$ ).

For quorum sensing (AI-1 and AI-2), the % induction was calculated as follows for MT102 and F117 fluorescence of GFP, and the calculations were the same for MM32 bioluminescence. Thus, the percentage of fluorescence induction was calculated as follows: **% Fluorescence = (Signal<sub>SN/E</sub> - Signal<sub>Control</sub>)/Signal<sub>Control</sub> \* 100** with the fluorescence (GFP) signal normalized to  $OD_{630nm}$  after subtraction of the culture media, with **Signal<sub>SN/E</sub> =  $dGFP/dOD_{630nm} = (GFP_{SN} - GFP_{media})/(OD_{SN630nm} - OD_{media630nm})$**  where  $GFP_{SN}$  and  $OD_{SN630nm}$  correspond to the wells containing the biosensor with the tested supernatant/extract and  $GFP_{media}$  and  $OD_{media630nm}$  correspond to the controls culture medium alone without biosensor (LB or MB) and on the other hand: **Signal<sub>Control</sub> =  $dGFP_{control}/dOD_{control630nm} = (GFP_{Control} - GFP_{media})/(OD_{Control630nm} - OD_{media630nm})$**  where  $GFP_{control}$  and  $OD_{control}$  correspond to biosensor wells with sterile culture medium of supernatants or solvent of extracts.

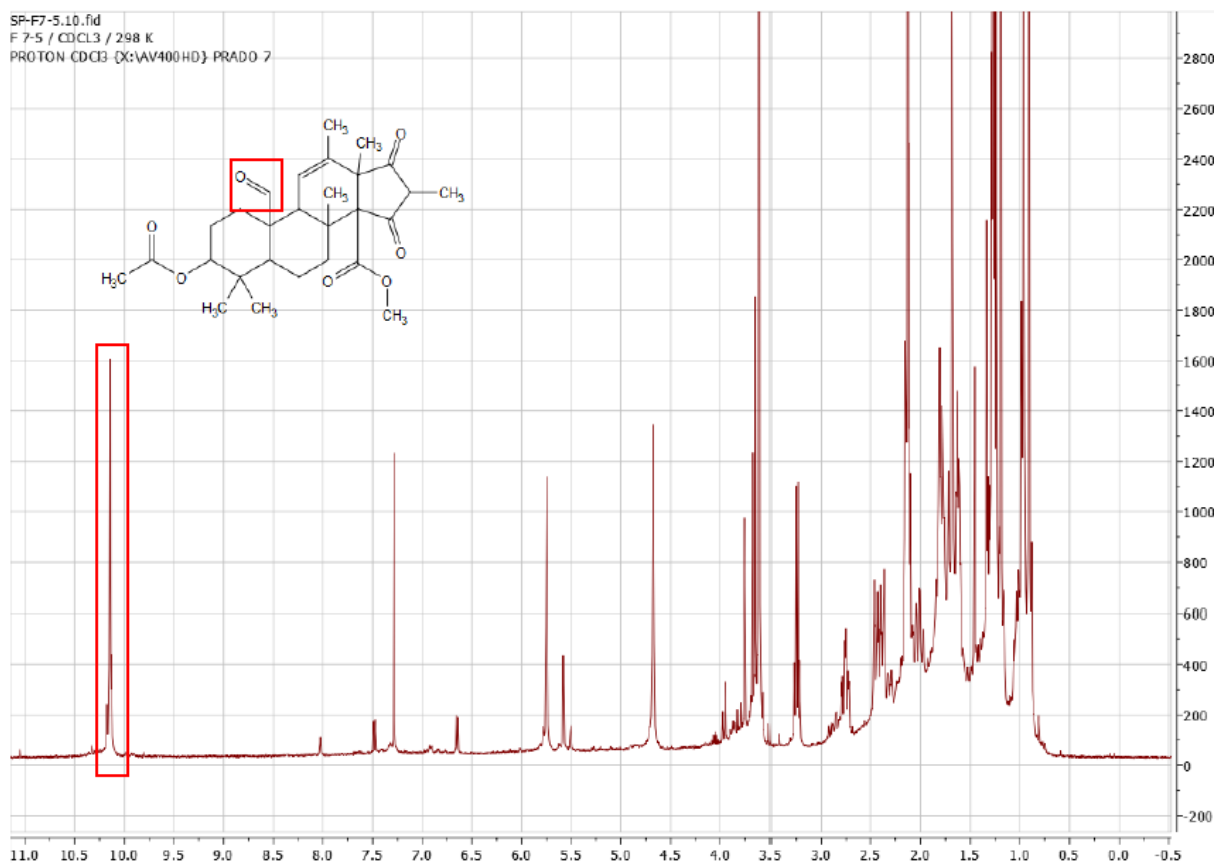
To evaluate the inhibition of biofilm formation and quorum sensing, similar calculations were performed as mentioned above. The percentage of inhibition was calculated for purple coloring  $OD_{540nm}$  (biofilm test), bioluminescence (MM32) and GFP fluorescence (MT102 and F117). The % inhibition was calculated as follows: **% fluorescence = (Signal<sub>Control</sub> - Signal<sub>SN/E</sub>)/Signal<sub>Control</sub> \* 100**. However,  $GFP_{control}$  and  $OD_{control}$  correspond to the biosensor with AHLs or DPD in the presence of supernatant culture medium or solvent. The

biofilm inhibition test corresponds to the reporter strains (*Vibrio harveyi* or *Labrenzia* sp.) in the presence of supernatant culture medium or solvent.

The results of the biotests were processed separately, and the statistical tests (Mann–Whitney tests) were performed using GraphPad Prism 8. The results were then transformed into a binary dataset based on significance and added to the phylogenetic trees via the iTOL online platform.

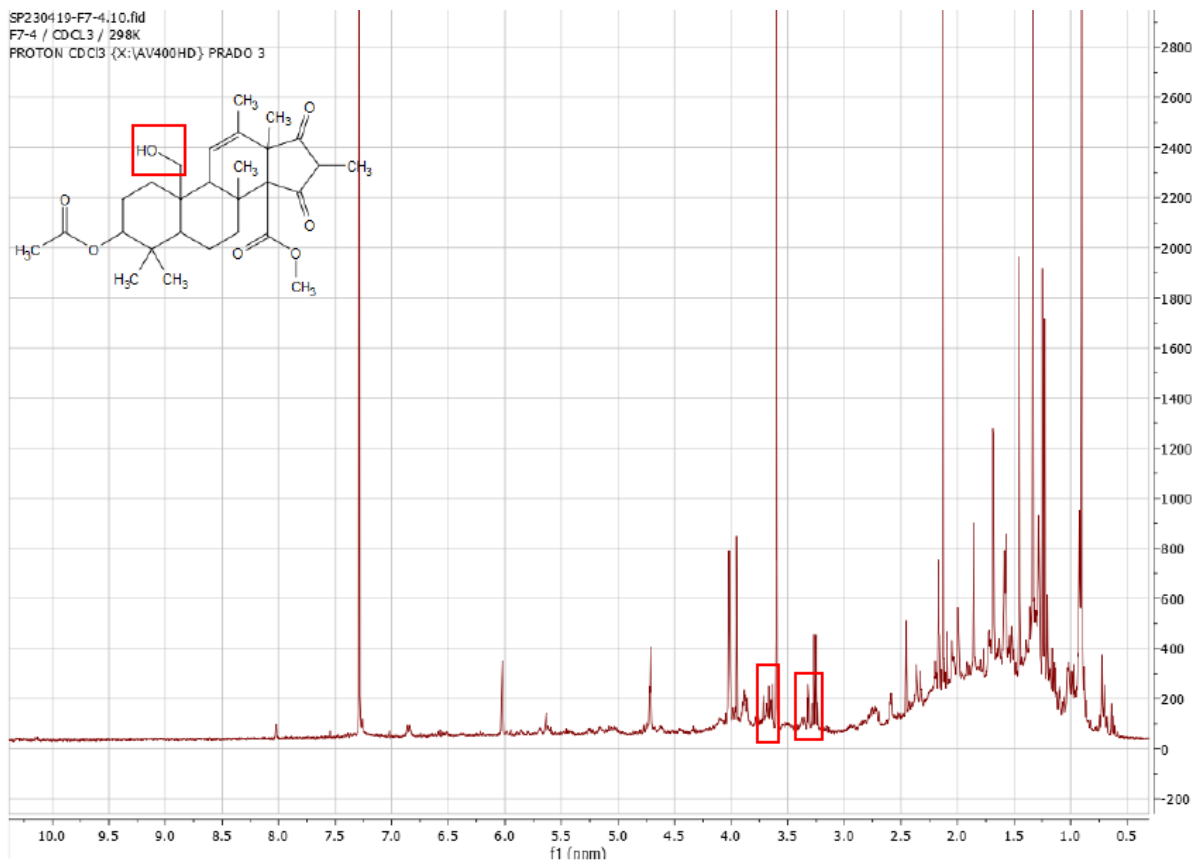
# Annexes du Chapitre V

## Figures Supplémentaires

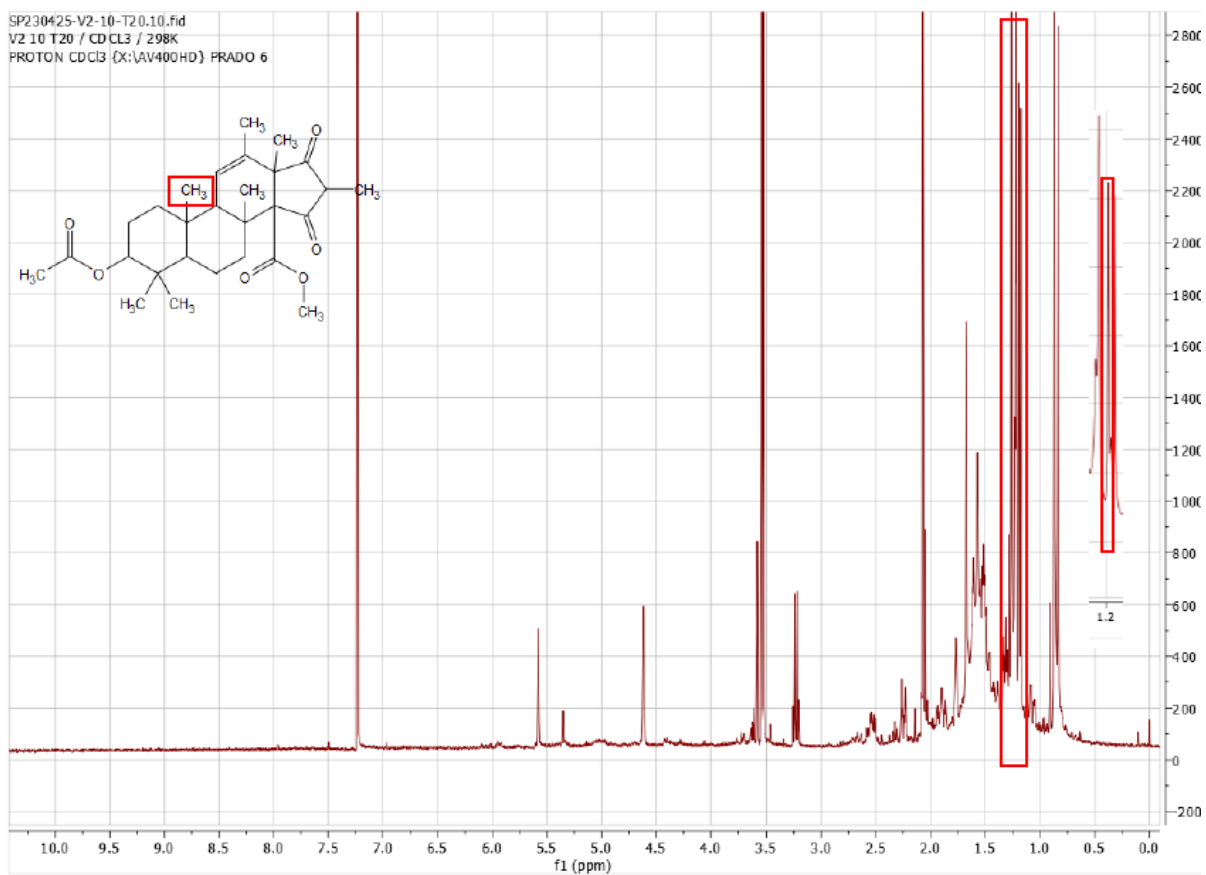


Supp. Figure V.1: <sup>1</sup>H RMN de l'andrastine A.

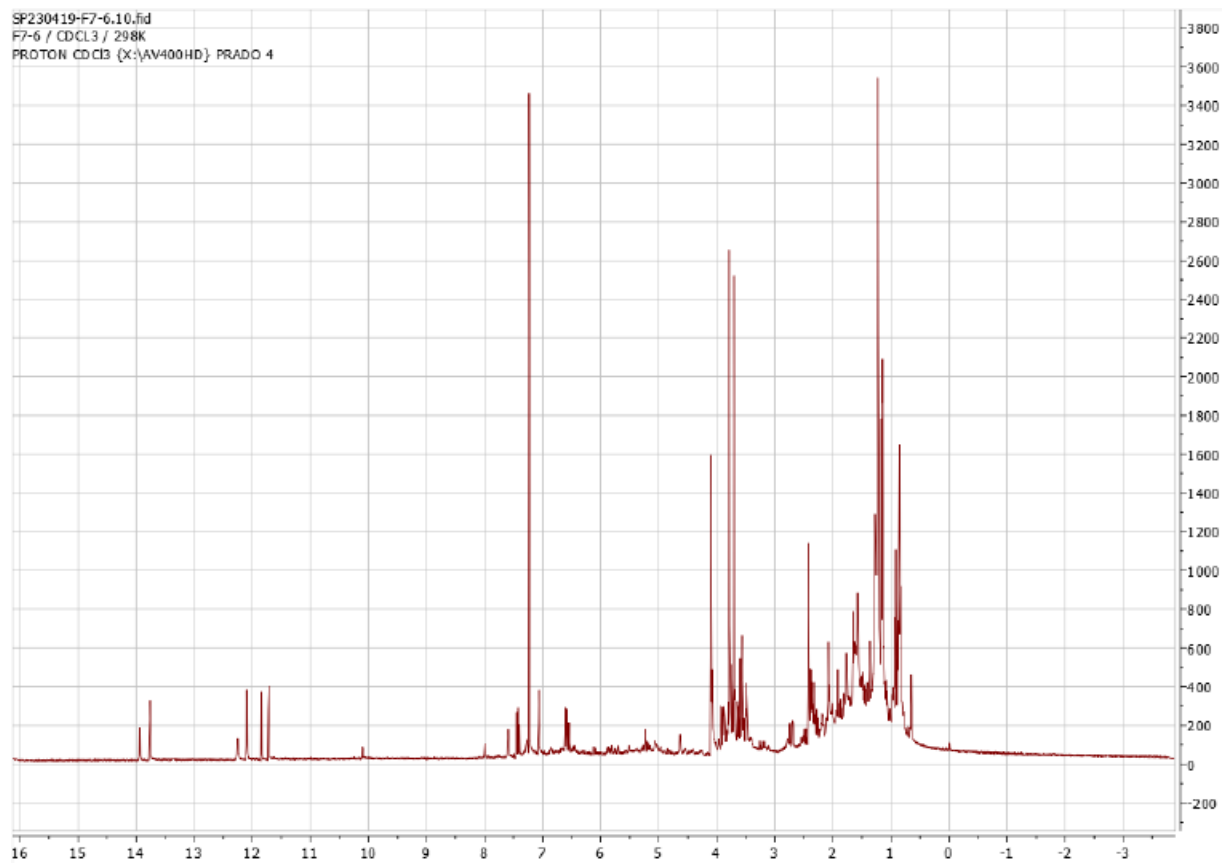




Supp. Figure V.2:  $^1\text{H}$  RMN de l'andrastine B



Supp. Figure V.3:  $^1\text{H}$  RMN de l'andrastine C



Supp. Figure V.4:  $^1\text{H}$  RMN de la fraction bioactive F7-6

# Valorisations scientifiques

## 1. Articles

### A. Articles soumis

**Emilie Adouane**, Camille Mercier, Jeanne Mabelle, Emma Willocquet, Laurent Intertaglia, Bertille Burgunter-Delamare, Catherine Leblanc, Sylvie Rousvoal, Raphaël Lami and Soizic Prado. Importance of quorum sensing crosstalk in the brown alga *Saccharina latissima* epimicrobiota. *Science*, Cell Press. Submitted in September 2023.

**Emilie Adouane**, Cédric Hubas, Catherine Leblanc, Raphaël Lami and Soizic Prado. Multi-Omics Analysis of the Microbiome and Metabolome into the surface of *Saccharina latissima* (Laminariales, Phaeophyceae). *Metabolomics*. Submitted in September 2023.

### B. Article en préparation

**Emilie Adouane**, Sylvie Rousvoal, Cedric Hubas, Catherine Leblanc, Raphaël Lami and Soizic Prado. Effect of quorum sensing compounds on microbial communities within the epimicrobiota of *Saccharina latissima*. In prep.

## 1. Liste des communications orales

**Emilie Adouane**, Camille Mercier, Emma Willocquet, Jeanne Mabelle, Laurent Intertaglia, Catherine Leblanc, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Deciphering the marine algal holobiont interactions for the discovery of new eco-compatible antifoulings – Cultivable approach and research of antifouling activities ». Séminaire CPNFB-BIM du MCAM, MNHN, Paris (France), janvier 2023.

**Emilie Adouane**, Camille Mercier, Emma Willocquet, Jeanne Mabelle, Laurent Intertaglia, Catherine Leblanc, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Deciphering the marine algal holobiont interactions for the discovery of new eco-compatible antifoulings ». Workshop Biofouling Marin – LBCM, Lorient (France), novembre 2022.

**Emilie Adouane**, Camille Mercier, Emma Willocquet, Jeanne Mabelle, Laurent Intertaglia, Catherine Leblanc, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Deciphering the marine algal holobiont interactions for the discovery of new eco-compatible antifoulings – Chap 2. ». Journées des doctorants de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, Banyuls-sur-Mer (France), octobre 2022.

**Emilie Adouane**, Cédric Hubas, Camille Mercier, Emma Willocquet, Laurent Intertaglia, Catherine Leblanc, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Deciphering the marine algal holobiont interactions for the discovery of new eco-compatible antifoulings – Chap 1 & 2 ». Séminaire CPNFB-BIM du MCAM, MNHN, Paris (France), juin 2022

Emilie Adouane, **Raphaël Lami**, Soizic Prado. « Exploration des interactions dans l'holobionte algal pour la découverte de nouveaux antifoulings éco-compatibles ». Journée thématique du GDR B2i – Bio-ingénierie des interfaces – Sorbonne Université, Paris (France), Mars 2022

**Emilie Adouane**, Cédric Hubas, Catherine Leblanc, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Exploration des interactions dans l'holobionte algal pour la découverte de nouveaux antifoulings éco-compatibles – Chapitre 1 ». Séminaire LBBM-BAE, Banyuls-sur-Mer (France), février 2022

**Emilie Adouane**, Emma Willocquet, Laurent Intertaglia, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Exploration des interactions dans l'holobionte algal pour la découverte de nouveaux antifoulings éco-compatibles ». Journées des doctorants de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, Banyuls-sur-Mer (France), octobre 2021

**Emilie Adouane**, Anne Tourneroché, Marine Vallet, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Deciphering the marine algal holobiont interactions for the discovery of new eco-compatible antifoulings ». 36th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology (ISCE) session Marine Holobiont – Stellenbosch (Afrique du Sud), septembre 2021

**Emilie Adouane**, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Isolement bio-inspiré et identification des rôles écologiques de composés perturbant les biofilms algaux : une approche innovante de biomimétisme pour l'identification de nouveaux antifoulings éco-compatibles ». Séminaire LBBM-BAE, Banyuls-sur-Mer (France), septembre 2021

Emilie Adouane, Anne Tourneroché, Marine Vallet, Raphaël Lami, **Soizic Prado**. « Chemical ecology of marine fungi as inspiration for new natural products discovery ». 3rd International conference on Marine Fungal Natural Products (MAFNAP), Nice (France), juillet 2021

**Emilie Adouane**, Anne Tourneroché, Marine Vallet, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Bio-inspired isolation and identification of the ecological roles of compounds disrupting algal biofilms: an innovative approach of biomimetic for the identification of new eco-compatible antifoulings ». Séminaire CPNFB-BIM du MCAM, MNHN, Paris (France), mars 2021

## 2. Communications orales « Flash »

**Emilie Adouane**, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Deciphering the marine algal holobiont interactions for the discovery of new eco-compatible antifouling - Summary ». 15<sup>ème</sup> journées scientifique du RFMF, Perpignan (France), mai 2023.

**Emilie Adouane**, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Deciphering the marine algal holobiont interactions for the discovery of new eco-compatible antifoulings – Short comm. ». LC-MS-based Marine Metabolomics Workshop, Paris (France), octobre 2022

## 3. Communication par poster

**Emilie Adouane**, Adrien Delorme, Camille Mercier, Jeanne Mamelie, Emma Willocquet, Laurent Intertaglia, Raphaël Lami, Soizic Prado. « Antibiofilm activities of fungal strains from the epimicrobiota of *S. latissima* ». 15<sup>èmes</sup> journées scientifiques du RFMF, Perpignan (France), mai 2023. (Voir Annexe Poster)

## 4. Autres communications

**Emilie Adouane**, Camille Ferré, Raphaël Lami. « A la découverte des biofilms ». Fête de la science de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, Banyuls-sur-Mer (France), octobre 2022.

**Emilie Adouane**, Raphaël Lami. « A la découverte des biofilms ». Fête de la science de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, Banyuls-sur-Mer (France), octobre 2021.

## 5. Autres articles parus pendant la thèse

Ces articles proviennent de travaux précédemment effectués mais dont les papiers ont été écrits et corrigés pendant ma thèse.

Romani, M., **Adouane, E.**, Carrion, C., Veckerlé, C., Boeuf, D., Fernandez, F., Lefèvre, M., Intertaglia, L., Rodrigues, A.M.S., Lebaron, P., Lami, R., 2021. Diversity and activities of pioneer bacteria, algae, and fungi colonizing ceramic roof tiles during the first year of outdoor exposure. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 162, 105230.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105230>

Vincent, A.T., Intertaglia, L., Loyer, V., Paquet, V.E., **Adouane, É.**, Martin, P., Bérard, C., Lami, R., Charette, S.J., 2021. *AsaGEI2d*: a new variant of a genomic island identified in a group of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolated from France, which bears the pAsa7 plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* 368, fnab021. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab021>

# Poster: "Antibiofilm activities of fungal strains from the epimicrobiota of *Saccharina latissima*"

15<sup>ème</sup> journées scientifiques du RFMF – 24-26 Mai 2023 - Perpignan



## Antibiofilm activities of fungal strains from the epimicrobiota of *S. latissima*



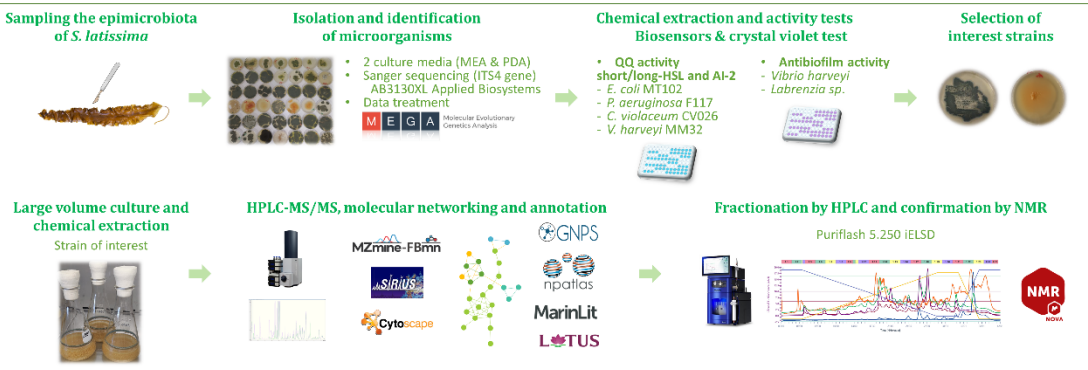
Aduane E.<sup>1,2</sup>, Delorme A.<sup>1</sup>, Mercier C.<sup>2</sup>, Mamelle J.<sup>2</sup>, Willcoquet E.<sup>2</sup>, Intertaglia L.<sup>3</sup>, Lami R.<sup>2\*</sup> and Prado S.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Muséum National d'Histoire Naturelle, Unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes (MCAM), CNRS – UMR 7245, Paris, France  
<sup>2</sup>Sorbonne Université, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), CNRS – UAR 3579, Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, France  
<sup>3</sup>Sorbonne Université, CNRS, Bio2Mar, Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, France

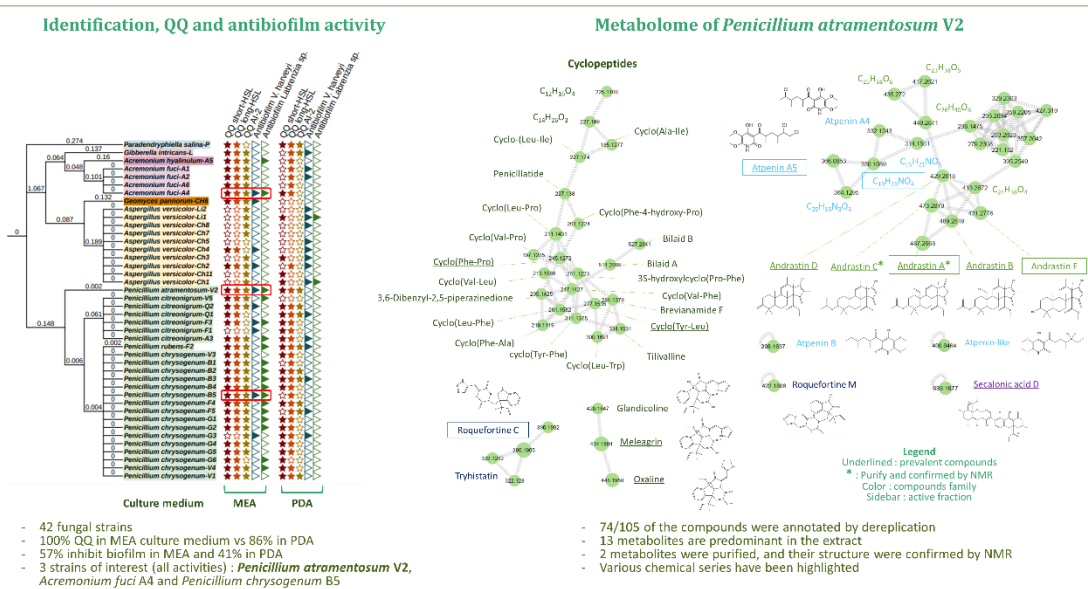
### Introduction

Microbial biofilms cause many problems for military, industrial and recreational marine activities. Most of the antifouling compounds currently in use are highly toxic biocides that have a significant impact on the natural environment. No sustainable and environmentally friendly alternatives have yet been developed. However, such chemical compounds exist in nature and many marine species have developed strategies to protect themselves from biological fouling. This is particularly the case of macroalgae that secrete molecules targeting quorum sensing, a mode of intercellular communication involved in the formation of biofilms. The search for quorum quenching (QQ) compounds, mimicking this key mechanism, is thus an attractive strategy to identify new antifouling substances. The knowledge of the algal holobiont has revealed the existence of a microbiota associated with macroalgae capable of affecting the fitness of the host alga. The structure of microbial communities is intimately linked to the production of chemical mediators by this microbiota. More precisely, we demonstrated that the epimicrobiota of the alga *Saccharina latissima*, is the seat of the production of chemical signals capable of inhibiting the bacterial QS and by extension inhibiting the formation of biofilms. In this context, we have cultivated and isolated fungal strains present on the surface of *S. latissima* and tested their anti-QS and anti-biofilm capacities on bacterial biofilm in order to isolate potential new eco-compatible antifouling.

### Materials and Methods



### Results



### Conclusions

- The bioactivity tests highlighted 3 strains of major interest (among 42 isolated) for the identification of antibiofilm compounds.
- The metabolome of *Penicillium atramentosum* has a high diversity of compounds and Sirius dereplication has allowed to annotate numerous metabolites of the molecular network. We also determined which are the predominant and actives compounds in the extract.
- Chemical analysis of *Acremonium fuci* A4 is under progress and already revealed original compounds

1. Schmid, R., Heckerich, S., Korf, A. et al. Integrative analysis of metatranscriptomic mass spectrometry data in MDN. *Nature Biotechnology* (2023). <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01090-2>  
 2. Kai Döllhopf, Marius Probsthauer, Marius Lomax, Alexander A. Khorov, Alamy V. Mehra, Martin Muegel, Peter C. Dorrestein, Juhn Rossio, and Sebastian Böcker. SIRIUS 4: Tuning tandem mass spectrometry into metabolite structure information. *Nature Methods* 16, 295–302, 2019.  
 3. Kai Döllhopf, Soledad Fajó, Nicolas Marius Probsthauer, Raphael Böber, Marius Lomax, Martin Muegel, Marie A. Hoffmann, Daniel Reine, Willem H. Geens, Juhn Rossio, Peter C. Dorrestein and Sebastian Böcker. Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. *Nature Biotechnology* 2020.  
 4. Nathias, L. F., Perez, D., Schmid, R. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat. Methods* 17, 905–908 (2020).

## Références bibliographiques

---

- Abbamondi, G.R., De Rosa, S., Iodice, C., Tommonaro, G., 2014. Cyclic dipeptides produced by marine sponge-associated bacteria as quorum sensing signals. *Nat. Prod. Commun.* 9, 1934578X1400900225. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900225>
- Abdel-Gawad, K.M., Hifney, A.F., Issa, A.A., Gomaa, M., 2014. Spatio-temporal, environmental factors, and host identity shape culturable-epibiotic fungi of seaweeds in the Red Sea, Egypt. *Hydrobiologia* 740, 37–49. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1935-0>
- Abdel-Lateff, A., König, G.M., Fisch, K.M., Höller, U., Jones, P.G., Wright, A.D., 2002. New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. *J. Nat. Prod.* 65, 1605–1611. <https://doi.org/10.1021/np020128p>
- Abisado, R.G., Benomar, S., Klaus, J.R., Dandekar, A.A., Chandler, J.R., 2018. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *mBio* 9, e02331-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02331-17>
- Adams, J.M., Gallagher, J.A., Donnison, I.S., 2009. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *J. Appl. Phycol.* 21, 569–574. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9384-7>
- Airoldi, L., Balata, D., Beck, M.W., 2008. The Gray Zone: Relationships between habitat loss and marine diversity and their applications in conservation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Marine ecology: A tribute to the life and work of John S. Gray* 366, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.07.034>
- Al-Bari, M.A.A., Bhuiyan, M.S.A., Flores, M.E., Petrosyan, P., García-Varela, M., Islam, M.A.U., 2005. *Streptomyces bangladeshensis* sp. nov., isolated from soil, which produces bis-(2-ethylhexyl)phthalate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1973–1977. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63516-0>
- Albuquerque, P., Casadevall, A., 2012. Quorum sensing in fungi—a review. *Med. Mycol.* 50, 337–345. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>
- Ali, H., Ries, M.I., Nijland, J.G., Lankhorst, P.P., Hankemeier, T., Bovenberg, R.A.L., Vreeken, R.J., Driessen, A.J.M., 2013. A Branched Biosynthetic Pathway Is Involved in Production of Roquefortine and Related Compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLOS ONE* 8, e65328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065328>
- Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coat.* 59, 2–20. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2007.01.017>
- Alsufyani, T., Califano, G., Deicke, M., Grueneberg, J., Weiss, A., Engelen, A.H., Kwantes, M., Mohr, J.F., Ulrich, J.F., Wichard, T., 2020. Macroalgal–bacterial interactions: identification and role of thallusin in morphogenesis of the seaweed *Ulva* (Chlorophyta). *J. Exp. Bot.* 71, 3340–3349. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa066>
- Alvarez, E., Meesschaert, B., Montenegro, E., Gutiérrez, S., Diez, B., Barredo, J.-L., Marín, J.-F., 1993. The isopenicillin N acyltransferase of *Penicillium Chrysogenum* has isopenicillin N amidohydrolase, 6-APA acyltransferase, penicillin transacylase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single pen DE gene. *Eur. J. Biochem.* 215, 323–332. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18038.x>
- Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P., 2011. Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Divers.* 50, 3–19. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0116-y>



- Alzieu, C.L., Sanjuan, J., Deltreil, J.P., Borel, M., 1986. Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Mar. Pollut. Bull.* 17, 494–498.  
[https://doi.org/10.1016/0025-326X\(86\)90636-3](https://doi.org/10.1016/0025-326X(86)90636-3)
- An, X., Zhang, B., Zhang, H., Li, Y., Zheng, W., Yu, Z., Fu, L., Zheng, T., 2015. Discovery of an algicidal compound from *Brevibacterium sp.* BS01 and its effect on a harmful algal bloom-causing species, *Alexandrium tamarense*. *Front. Microbiol.* 6.
- Andersen, G.S., Steen, H., Christie, H., Fredriksen, S., Moy, F.E., 2011. Seasonal patterns of sporophyte growth, fertility, fouling, and mortality of *Saccharina latissima* in Skagerrak, Norway: Implications for forest recovery. *J. Mar. Sci.* 2011, e690375.  
<https://doi.org/10.1155/2011/690375>
- Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin, S., Givskov, M., 2001. gfp-Based *N*-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for detection of bacterial communication. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 575–585.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.575-585.2001>
- Apostolova, E., Lukova, P., Baldzhieva, A., Katsarov, P., Nikolova, M., Iliev, I., Peychev, L., Trica, B., Oancea, F., Delattre, C., Kokova, V., 2020. Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effects of Fucoidan: A Review. *Polymers* 12, 2338.  
<https://doi.org/10.3390/polym12102338>
- Araújo, R.M., Assis, J., Aguillar, R., Airoidi, L., Bárbara, I., Bartsch, I., Bekkby, T., Christie, H., Davoult, D., Derrien-Courtel, S., Fernandez, C., Fredriksen, S., Gevaert, F., Gundersen, H., Le Gal, A., Lévêque, L., Mieszkowska, N., Norderhaug, K.M., Oliveira, P., Puente, A., Rico, J.M., Rinde, E., Schubert, H., Strain, E.M., Valero, M., Viard, F., Sousa-Pinto, I., 2016. Status, trends and drivers of kelp forests in Europe: an expert assessment. *Biodivers. Conserv.* 25, 1319–1348. <https://doi.org/10.1007/s10531-016-1141-7>
- Armstrong, E., Rogerson, A., Leftley, J.W., 2000. The abundance of heterotrophic protists associated with intertidal seaweeds. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 50, 415–424.  
<https://doi.org/10.1006/ecss.1999.0577>
- Ascenso, O.S., Marques, J.C., Santos, A.R., Xavier, K.B., Ventura, M.R., Maycock, C.D., 2011. An efficient synthesis of the precursor of AI-2, the signalling molecule for inter-species quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 1236–1241.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.12.036>
- Assis, J., Tavares, D., Tavares, J., Cunha, A., Alberto, F., Serrão, E.A., 2009. Findkelp, a GIS-Based community participation project to assess portuguese kelp conservation status. *J. Coast. Res.* 1469–1473.
- Atkinson, S., Williams, P., 2009. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface* 6, 959–978. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0203>
- Balakirev, E.S., Krupnova, T.N., Ayala, F.J., 2012. Symbiotic associations in the phenotypically-diverse brown alga *Saccharina japonica*. *PloS One* 7, e39587.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039587>
- Ballestrero, F., Thomas, T., Burke, C., Egan, S., Kjelleberg, S., 2010. Identification of compounds with bioactivity against the nematode *Caenorhabditis elegans* by a screen based on the functional genomics of the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* D2. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5710–5717.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00695-10>
- Bamford, C.V., d’Mello, A., Nobbs, A.H., Dutton, L.C., Vickerman, M.M., Jenkinson, H.F., 2009. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through

- intergeneric communication. *Infect. Immun.* 77, 3696–3704.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00438-09>
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., Lindequist, U., 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture, Seaweed-Based Integrated Mariculture* 252, 79–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.051>
- Bartsch, I., Vogt, J., Pehlke, C., Hanelt, D., 2013. Prevailing sea surface temperatures inhibit summer reproduction of the kelp *Laminaria digitata* at Helgoland (North Sea). *J. Phycol.* 49, 1061–1073. <https://doi.org/10.1111/jpy.12125>
- Bassler, B.L., 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 582–587. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(99\)00025-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(99)00025-9)
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., Silverman, M.R., 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* 9, 773–786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01737.x>
- Batista, D., Carvalho, A.P., Costa, R., Coutinho, R., Dobretsov, S., 2014. Extracts of macroalgae from the Brazilian coast inhibit bacterial quorum sensing. *Bot. Mar.* 57, 441–447. <https://doi.org/10.1515/bot-2014-0031>
- Beckers, B., Op De Beeck, M., Thijs, S., Truyens, S., Weyens, N., Boerjan, W., Vangronsveld, J., 2016. Performance of 16s rDNA Primer Pairs in the Study of Rhizosphere and Endosphere Bacterial Microbiomes in Metabarcoding Studies. *Front. Microbiol.* 7.
- Bengtsson, M.M., Øvreås, L., 2010. Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*. *BMC Microbiol.* 10, 261. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-261>
- Bengtsson, M.M., Sjøtun, K., Lanzén, A., Øvreås, L., 2012. Bacterial diversity in relation to secondary production and succession on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*. *ISME J.* 6, 2188–2198. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.67>
- Bengtsson, M.M., Sjøtun, K., Øvreås, L., 2010. Seasonal dynamics of bacterial biofilms on the kelp *Laminaria hyperborea*. *Aquat. Microb. Ecol.* 60, 71–83.  
<https://doi.org/10.3354/ame01409>
- Bergmann, W., Burke, D.C., 1956. Contributions to the study of marine products. XL. The Nucleosides of Sponges. <sup>1</sup> IV. Spongosine <sup>2</sup>. *J. Org. Chem.* 21, 226–228.  
<https://doi.org/10.1021/jo01108a020>
- Bertin, M.J., Schwartz, S.L., Lee, J., Korobeynikov, A., Dorrestein, P.C., Gerwick, L., Gerwick, W.H., 2015. Spongosine production by a *Vibrio harveyi* strain associated with the sponge *Tectitethya crypta*. *J. Nat. Prod.* 78, 493–499.  
<https://doi.org/10.1021/np5009762>
- Bertin, M.J., Zimba, P.V., Beauchesne, K.R., Huncik, K.M., Moeller, P.D.R., 2012. Identification of toxic fatty acid amides isolated from the harmful alga *Prymnesium parvum* carter. *Harmful Algae* 20, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.08.005>
- Bertocci, I., Araújo, R., Oliveira, P., Sousa-Pinto, I., 2015. REVIEW: Potential effects of kelp species on local fisheries. *J. Appl. Ecol.* 52, 1216–1226. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12483>
- Bhushan, B., 2009. Biomimetics: lessons from nature—an overview. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 367, 1445–1486. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0011>

- Bhushan, B., Jung, Y.C., Koch, K., 2009. Micro-, nano- and hierarchical structures for superhydrophobicity, self-cleaning and low adhesion. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0014>
- Bina, X.R., Taylor, D.L., Vikram, A., Ante, V.M., Bina, J.E., 2013. *Vibrio cholerae* ToxR Downregulates Virulence Factor Production in Response to *Cyclo*(Phe-Pro). *mBio* 4, 10.1128/mbio.00366-13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00366-13>
- Birchenough, A.C., Barnes, N., Evans, S.M., Hinz, H., Krönke, I., Moss, C., 2002. A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 534–543. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00275-2)
- Blackburn, T.M., Bellard, C., Ricciardi, A., 2019. Alien versus native species as drivers of recent extinctions. *Front. Ecol. Environ.* 17, 203–207. <https://doi.org/10.1002/fee.2020>
- Blanchet, E., Prado, S., Stien, D., Oliveira da Silva, J., Ferandin, Y., Batailler, N., Intertaglia, L., Escargueil, A., Lami, R., 2017. Quorum sensing and quorum quenching in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* Microbiota. *Front. Mar. Sci.* 4.
- Bloecher, N., Olsen, Y., Guenther, J., 2013. Variability of biofouling communities on fish cage nets: A 1-year field study at a Norwegian salmon farm. *Aquaculture* 416–417, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.025>
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R., 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 23, 26–78. <https://doi.org/10.1039/B502792F>
- Boddy, L., 2016. Chapter 11 - Fungi, Ecosystems, and Global Change, in: Watkinson, S.C., Boddy, L., Money, N.P. (Eds.), *The Fungi* (Third Edition). Academic Press, Boston, pp. 361–400. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00011-6>
- Bofinger, M.R., de Sousa, L.S., Fontes, J.E.N., Marsaioli, A.J., 2017. Diketopiperazines as cross-communication quorum-sensing signals between *Cronobacter sakazakii* and *Bacillus cereus*. *ACS Omega* 2, 1003–1008. <https://doi.org/10.1021/acsomega.6b00513>
- Boilard, A., Dubé, C.E., Gruet, C., Mercière, A., Hernandez-Agreda, A., Derome, N., 2020. Defining coral bleaching as a microbial dysbiosis within the coral holobiont. *Microorganisms* 8, 1682. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111682>
- Bold, H.C., Wynne, M.J., 1985. *Introduction to the algae: structure and reproduction*, 2nd ed. ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Bolinches, J., Lemos, M.L., Barja, J.L., 1988. Population dynamics of heterotrophic bacterial communities associated with *Fucus vesiculosus* and *Ulva rigida* in an estuary. *Microb. Ecol.* 15, 345–357. <https://doi.org/10.1007/BF02012647>
- Bolton, J.J., 2010. The biogeography of kelps (Laminariales, Phaeophyceae): a global analysis with new insights from recent advances in molecular phylogenetics. *Helgol. Mar. Res.* 64, 263–279. <https://doi.org/10.1007/s10152-010-0211-6>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvall, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciolk, T.,

- Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., Mclver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hoof, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857.  
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bonthond, G., Bayer, T., Krueger-Hadfield, S.A., Barboza, F.R., Nakaoka, M., Valero, M., Wang, G., Künzel, S., Weinberger, F., 2020. How do microbiota associated with an invasive seaweed vary across scales? *Mol. Ecol.* 29, 2094–2108.  
<https://doi.org/10.1111/mec.15470>
- Borchardt, S.A., Allain, E.J., Michels, J.J., Stearns, G.W., Kelly, R.F., McCoy, W.F., 2001. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3174–3179.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3174-3179.2001>
- Bordenstein, S.R., Theis, K.R., 2015. Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLOS Biol.* 13, e1002226.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
- Bourne, D.G., Garren, M., Work, T.M., Rosenberg, E., Smith, G.W., Harvell, C.D., 2009. Microbial disease and the coral holobiont. *Trends Microbiol.* 17, 554–562.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.09.004>
- Bowman, J.P., 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar. Drugs* 5, 220–241.  
<https://doi.org/10.3390/md504220>
- Bressy, C., Lejars, M., 2014. Marine Fouling : An Overview. *J. Ocean Technol.* 9, 19–28.
- Britstein, M., Saurav, K., Teta, R., Sala, G.D., Bar-Shalom, R., Stoppelli, N., Zoccarato, L., Costantino, V., Steindler, L., 2018. Identification and chemical characterization of *N*-acyl-homoserine lactone quorum sensing signals across sponge species and time. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, fix182. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix182>
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C., Landini, P., 2006. Gene Expression Regulation by the Curli Activator CsgD Protein: Modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J. Bacteriol.* 188, 2027–2037.  
<https://doi.org/10.1128/jb.188.6.2027-2037.2006>
- Brombacher, E., Dorel, C., Zehnder, A.J.B., Landini, P., 2003. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology* 149, 2847–2857.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.26306-0>
- Bruhn, J.B., Gram, L., Belas, R., 2007. Production of antibacterial compounds and biofilm formation by *Roseobacter* species are influenced by culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 442–450. <https://doi.org/10.1128/AEM.02238-06>
- Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Hummerstone, L.G., Burt, G.R., 1986. The decline of the gastropod *Nucella Lapillus* around South-West England: Evidence for the effect of tributyltin

- from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 66, 611–640.  
<https://doi.org/10.1017/S0025315400042247>
- Bunet, R., 2020. Biofouling et antifouling biologique. pp. 293–312.
- Burgess, J.G., Boyd, K.G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U., Pisacane, T., Granmo, Å., Adams, D.R., 2003. The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling* 19, 197–205.  
<https://doi.org/10.1080/0892701031000061778>
- Burgunter-Delamare, B., 2022. Études des interactions hôte-microbiote chez l’algue brune *Saccharina latissima* (Thèse de doctorat). Sorbonne université.
- Burgunter-Delamare, B., Boyen, C., Dittami, S.M., 2021. Effect of essential oil- and iodine treatments on the bacterial microbiota of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *J. Appl. Phycol.* 33, 459–470. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02286-y>
- Burgunter-Delamare, B., KleinJan, H., Frioux, C., Fremy, E., Wagner, M., Corre, E., Le Salver, A., Leroux, C., Leblanc, C., Boyen, C., Siegel, A., Dittami, S.M., 2020. Metabolic complementarity between a brown alga and associated cultivable bacteria provide indications of beneficial interactions. *Front. Mar. Sci.* 7.
- Burgunter-Delamare, B., Rousvoal, S., Legeay, E., Tanguy, G., Fredriksen, S., Boyen, C., Dittami, S.M., 2023. The *Saccharina latissima* microbiome: Effects of region, season, and physiology. *Front. Microbiol.* 13, 1050939.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1050939>
- Burgunter-Delamare, B., Tanguy, G., Legeay, E., Boyen, C., Dittami, S.M., 2022. Effects of sampling and storage procedures on 16S rDNA amplicon sequencing results of kelp microbiomes. *Mar. Genomics* 63, 100944.  
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2022.100944>
- Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D., Kjelleberg, S., Thomas, T., 2011a. Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 14288–14293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101591108>
- Burke, C., Thomas, T., Lewis, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S., 2011b. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME J.* 5, 590–600. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.164>
- Buroni, S., Scoffone, V.C., Fumagalli, M., Makarov, V., Cagnone, M., Trespidi, G., De Rossi, E., Forneris, F., Riccardi, G., Chiarelli, L.R., 2018. Investigating the mechanism of action of diketopiperazines Inhibitors of the *Burkholderia cenocepacia* quorum sensing synthase Ceph: A site-directed mutagenesis Study. *Front. Pharmacol.* 9.
- Butterfield, N.J., 2000. *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology* 26, 386–404. [https://doi.org/10.1666/0094-8373\(2000\)026<0386:BPNGNS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1666/0094-8373(2000)026<0386:BPNGNS>2.0.CO;2)
- Cabanes, J., Chazarra, S., Garcia-Carmona, F., 1994. Kojic Acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 982–985. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03253.x>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callow, M., 1990. Ship fouling: problems and solutions. *Chem. Ind. Lond.* 123–127.

- Campbell, A.H., Harder, T., Nielsen, S., Kjelleberg, S., Steinberg, P.D., 2011. Climate change and disease: bleaching of a chemically defended seaweed. *Glob. Change Biol.* 17, 2958–2970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02456.x>
- Capra, E.J., Laub, M.T., 2012. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>
- Carlton, J.T., 1999. The scale and ecological consequences of biological invasions in the World's oceans. *Invasive Species Biodivers. Manag. Based Pap. Present. Norway United Nations UN Conf. Alien Species 2nd Trondheim Conf. Biodivers. Trondheim Nor.* 1-5 July 1996 195–212.
- Carriot, N., 2022. Caractérisation de la production métabolique de biofilms marins. : Vers une application à l'étude de biofilms complexes in situ (Thèse de doctorat). Toulon.
- Carroll, A.R., Copp, B.R., Davis, R.A., Keyzers, R.A., Prinsep, M.R., 2022. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 39, 1122–1171. <https://doi.org/10.1039/D1NP00076D>
- Carvalho, A.P., Batista, D., Dobretsov, S., Coutinho, R., 2017. Extracts of seaweeds as potential inhibitors of quorum sensing and bacterial growth. *J. Appl. Phycol.* 29, 789–797. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1014-1>
- Case, R.J., Longford, S.R., Campbell, A.H., Low, A., Tujula, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 2011. Temperature induced bacterial virulence and bleaching disease in a chemically defended marine macroalga. *Environ. Microbiol.* 13, 529–537. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02356.x>
- Catarino, M.D., Silva-Reis, R., Chouh, A., Silva, S., Braga, S.S., Silva, A.M.S., Cardoso, S.M., 2023. Applications of antioxidant secondary metabolites of *Sargassum* spp. *Mar. Drugs* 21, 172. <https://doi.org/10.3390/md21030172>
- Chakraborty, K., Kizhakkekalam, V.K., Joy, M., Chakraborty, R.D., 2020. Moving away from traditional antibiotic treatment: can macrocyclic lactones from marine macroalga-associated heterotroph be the alternatives? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 7117–7130. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10658-0>
- Chakraborty, K., Kizhakkekalam, V.K., Joy, M., Dhara, S., 2021. Difficidin class of polyketide antibiotics from marine macroalga-associated *Bacillus* as promising antibacterial agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 6395–6408. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11390-z>
- Champ, M.A., 2003. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 935–940. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00106-1)
- Champ, M.A., 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci. Total Environ., TBT Costs and Benefits- A* 258, 21–71. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00506-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00506-4)
- Chandel, A.K., Rao, L.V., Narasu, M.L., Singh, O.V., 2008. The realm of penicillin G acylase in  $\beta$ -lactam antibiotics. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.013>
- Chang, A., He, Q., Li, L., Yu, X., Sun, S., Zhu, H., 2021. Exploring the quorum sensing inhibition of isolated chrysin from *Penicillium chrysogenum* DXY-1. *Bioorganic Chem.* 111, 104894. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104894>
- Chang, A., Sun, S., Li, L., Dai, X., Li, H., He, Q., Zhu, H., 2019a. Tyrosol from marine Fungi, a novel Quorum sensing inhibitor against *Chromobacterium violaceum* and

- Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic Chem.* 91, 103140.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103140>
- Chang, A., Sun, S., Li, L., Dai, X., Li, H., He, Q., Zhu, H., 2019b. Tyrosol from marine Fungi, a novel quorum sensing inhibitor against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic Chem.* 91, 103140.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103140>
- Chapman, J., Hellio, C., Sullivan, T., Brown, R., Russell, S., Kitteringham, E., Le Nor, L., Regan, F., 2014. Bioinspired synthetic macroalgae: Examples from nature for antifouling applications. *Int. Biodeterior. Biodegrad., Special Issue: Biofilms* 86, 6–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.036>
- Chawla, H.S., Wenzel, G., 1987. In vitro selection for fusaric acid resistant barley plants. *Plant Breed.* 99, 159–163. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1987.tb01166.x>
- Chen, H.-K., Wang, L.-H., Chen, W.-N.U., Mayfield, A.B., Levy, O., Lin, C.-S., Chen, C.-S., 2017. Coral lipid bodies as the relay center interconnecting diel-dependent lipidomic changes in different cellular compartments. *Sci. Rep.* 7, 3244.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02722-z>
- Chen, J., Wang, B., Lu, Y., Guo, Y., Sun, J., Wei, B., Zhang, H., Wang, H., 2019. Quorum sensing inhibitors from marine microorganisms and their synthetic derivatives. *Mar. Drugs* 17, 80. <https://doi.org/10.3390/md17020080>
- Chen, J., Zang, Y., Yang, Z., Qu, T., Sun, T., Liang, S., Zhu, M., Wang, Y., Tang, X., 2022. Composition and functional diversity of epiphytic bacterial and fungal communities on marine macrophytes in an Intertidal Zone. *Front. Microbiol.* 13.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M., 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545–549. <https://doi.org/10.1038/415545a>
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., Zhou, S., 2016. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 138–149. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12438>
- Choi, Hyunjung, Kim, K., Han, J., Choi, Hyun, Jin, S.H., Lee, E.K., Shin, D.W., Lee, T.R., Lee, A.-Y., Noh, M., 2012. Kojic acid-induced IL-6 production in human keratinocytes plays a role in its anti-melanogenic activity in skin. *J. Dermatol. Sci.* 66, 207–215.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.03.002>
- Christie, H., Jørgensen, N.M., Norderhaug, K.M., Waage-Nielsen, E., 2003. Species distribution and habitat exploitation of fauna associated with kelp (*Laminaria Hyperborea*) along the Norwegian Coast. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 83, 687–699.  
<https://doi.org/10.1017/S0025315403007653h>
- Chung, I.K., Oak, J.H., Lee, J.A., Shin, J.A., Kim, J.G., Park, K.-S., 2013. Installing kelp forests/seaweed beds for mitigation and adaptation against global warming: Korean Project Overview. *ICES J. Mar. Sci.* 70, 1038–1044.  
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fss206>
- Cimino, G., De Rosa, S., De Stefano, S., 1984. Antiviral agents from a gorgonian, *Eunicella cavolini*. *Experientia* 40, 339–340. <https://doi.org/10.1007/BF01952539>
- Clare, A.S., Rittschof, D., Gerhart, D.J., Hooper, I.R., Bonaventura, J., 1999. Antisettlement and narcotic action of analogues of diterpene marine natural product antifoulants from octocorals. *Mar. Biotechnol.* 1, 427–436. <https://doi.org/10.1007/PL00011799>
- Cock, J.M., Collén, J., 2015. Independent emergence of complex multicellularity in the brown and red algae, in: Ruiz-Trillo, I., Nedelcu, A.M. (Eds.), *Evolutionary Transitions to*

- Multicellular Life: Principles and Mechanisms, *Advances in Marine Genomics*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 335–361. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9642-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9642-2_16)
- Coelho, S.M., Cock, J.M., 2020. Brown algal model organisms. *Annu. Rev. Genet.* 54, 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-030620-093031>
- Coelho-Souza, S.A., Jenkins, S.R., Casarin, A., Baeta-Neves, M.H., Salgado, L.T., Guimaraes, J.R.D., Coutinho, R., 2017. The effect of light on bacterial activity in a seaweed holobiont. *Microb. Ecol.* 74, 868–876. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0995-x>
- Connell, S., 2007. Connell SD (2007) Water quality and the loss of coral reefs and kelp forests: alternative states and the influence of fishing. In: Connell SD, Gillanders BM (eds) *Marine Ecology*. Oxford University Press, Melbourne, pp 556–568. pp. 556–568.
- Corre, S., Prieur, D., 1990. Density and morphology of epiphytic bacteria on the kelp *Laminaria digitata* 33, 515–524. <https://doi.org/10.1515/botm.1990.33.6.515>
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>
- Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition, 2018. . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2063–2073. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8787-x>
- Cruz, R., Arias, M.S., Arias, M.E., Soliveri, J., 1996. APHE-3 and APHE-4, two new pyrazoloisoquinolinone antibiotics produced by *Streptoverticillium griseocarneum* NCIMB 40447. *J. Antibiot. (Tokyo)* 49, 700–702. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.700>
- Cugini, C., Calfee, M.W., Farrow III, J.M., Morales, D.K., Pesci, E.C., Hogan, D.A., 2007. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 65, 896–906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05840.x>
- Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Valls, R., Hellio, C., Clare, A.S., Piovetti, L., 2008. Antifouling activity of meroditerpenoids from the marine brown alga *Halidrys siliquosa*. *J. Nat. Prod.* 71, 1121–1126. <https://doi.org/10.1021/np070110k>
- Cundell, A.M., Sleeter, T.D., Mitchell, R., 1977. Microbial populations associated with the surface of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Microb. Ecol.* 4, 81–91. <https://doi.org/10.1007/BF02010431>
- Cunha, L., Grenha, A., 2016. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Mar. Drugs* 14, 42. <https://doi.org/10.3390/md14030042>
- Dahms, H.U., Dobretsov, S., 2017. Antifouling Compounds from Marine Macroalgae. *Mar. Drugs* 15, 265. <https://doi.org/10.3390/md15090265>
- D’Almeida, R.E., Molina, R.D.I., Viola, C.M., Luciardi, M.C., Nieto Peñalver, C., Bardón, A., Arena, M.E., 2017. Comparison of seven structurally related coumarins on the inhibition of Quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum*. *Bioorganic Chem.* 73, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.05.011>
- Dang, H., Jiao, N., 2014. Perspectives on the microbial carbon pump with special reference to microbial respiration and ecosystem efficiency in large estuarine systems. *Biogeosciences* 11, 3887–3898. <https://doi.org/10.5194/bg-11-3887-2014>



- Dang, H., Lovell, C.R., 2015. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 91–138. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00037-15>
- Davey, M.E., O'toole, G.A., 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867. <https://doi.org/10.1128/mnbr.64.4.847-867.2000>
- Davière, J.-M., Achard, P., 2013. Gibberellin signaling in plants. *Development* 140, 1147–1151. <https://doi.org/10.1242/dev.087650>
- Davis, K.M., Zeinert, L., Byrne, A., Davis, J., Roemer, C., Wright, M., Parfrey, L.W., 2023. Successional dynamics of the cultivated kelp microbiome. *J. Phycol.* 59, 538–551. <https://doi.org/10.1111/jpy.13329>
- Dayton, P.K., 1985. Ecology of kelp communities. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16, 215–245. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.001243>
- de Jonge, L.P., Douma, R.D., Heijnen, J.J., van Gulik, W.M., 2012. Optimization of cold methanol quenching for quantitative metabolomics of *Penicillium chrysogenum*. *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.* 8, 727–735. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0367-3>
- De Nys, R., Steinberg, P.D., Willemsen, P., Dworjanyn, S.A., Gabelish, C.L., King, R.J., 1995. Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling* 8, 259–271. <https://doi.org/10.1080/08927019509378279>
- de Nys, R., Wright, A.D., König, G.M., Sticher, O., 1993. New halogenated furanones from the marine alga *Delisea pulchra* (cf. *fimbriata*). *Tetrahedron* 49, 11213–11220. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81808-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81808-1)
- Debbab, A., Aly, A.H., Proksch, P., 2012. Endophytes and associated marine derived fungi—ecological and chemical perspectives. *Fungal Divers.* 57, 45–83. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0191-8>
- Delebecq, G., Davoult, D., Menu, D., Janquin, M.-A., Dauvin, J.-C., Gevaert, F., 2013. Influence of local environmental conditions on the seasonal acclimation process and the daily integrated production rates of *Laminaria digitata* (Phaeophyta) in the English Channel. *Mar. Biol.* 160, 503–517. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2106-3>
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Deshmukh, S.K., Prakash, V., Ranjan, N., 2018. Marine fungi: A source of potential anticancer compounds. *Front. Microbiol.* 8.
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Hervé, V., Labbé, J., Lastovetsky, O.A., Mieszkin, S., Millet, L.J., Vajna, B., Junier, P., Bonfante, P., Krom, B.P., Olsson, S., van Elsas, J.D., Wick, L.Y., 2018. Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 335–352. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy008>
- Dias, L.C., de Oliveira, L.G., de Sousa, M.A., 2003. Total synthesis of (–)-pironetin. *Org. Lett.* 5, 265–268. <https://doi.org/10.1021/ol027211o>
- Diggle, S.P., Crusz, S.A., Cámara, M., 2007. Quorum sensing. *Curr. Biol.* 17, R907–R910. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.045>

- Dittami, S.M., Duboscq-Bidot, L., Perennou, M., Gobet, A., Corre, E., Boyen, C., Tonon, T., 2016. Host–microbe interactions as a driver of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures. *ISME J.* 10, 51–63. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.104>
- Dixit, D., Reddy, C. r. k., Trivedi, M. h., Gadhavi, D.K., 2020. Non-targeted metabolomics approach to assess the brown marine macroalga *Dictyota dichotoma* as a functional food using liquid chromatography with mass spectrometry. *Sep. Sci. PLUS* 3, 140–149. <https://doi.org/10.1002/sscp.201900109>
- Djombou Feunang, Y., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., Bolton, E., Greiner, R., Wishart, D.S., 2016. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *J. Cheminformatics* 8, 61. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y>
- Doberva, M., Stien, D., Sorres, J., Hue, N., Sanchez-Ferandin, S., Eparvier, V., Ferandin, Y., Lebaron, P., Lami, R., 2017. Large diversity and original structures of acyl-homoserine lactones in strain MOLA 401, a marine Rhodobacteraceae bacterium. *Front. Microbiol.* 8.
- Dobretsov, S., Abed, R.M.M., Al Maskari, S.M.S., Al Sabahi, J.N., Victor, R., 2011a. Cyanobacterial mats from hot springs produce antimicrobial compounds and quorum-sensing inhibitors under natural conditions. *J. Appl. Phycol.* 23, 983–993. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9627-2>
- Dobretsov, S., Abed, R.M.M., Teplitski, M., 2013. Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling* 29, 423–441. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.776042>
- Dobretsov, S., Rittschof, D., 2023. Biofouling and Antifouling: Interactions between microbes and larvae of invertebrates. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 6531. <https://doi.org/10.3390/ijms24076531>
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P., Paul, V.J., 2011b. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* 27, 893–905. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.609616>
- Dobretsov, S.V., Qian, P.-Y., 2002. Effect of bacteria associated with the green alga *Ulva reticulata* on marine micro- and macrofouling. *Biofouling* 18, 217–228. <https://doi.org/10.1080/08927010290013026>
- Dogs, M., Wemheuer, B., Wolter, L., Bergen, N., Daniel, R., Simon, M., Brinkhoff, T., 2017. Rhodobacteraceae on the marine brown alga *Fucus spiralis* are abundant and show physiological adaptation to an epiphytic lifestyle. *Syst. Appl. Microbiol.* 40, 370–382. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.05.006>
- Dong, S., Yang, J., Zhang, X.-Y., Shi, M., Song, X.-Y., Chen, X.-L., Zhang, Y.-Z., 2012. Cultivable alginate lyase-excreting bacteria associated with the Arctic brown alga *Laminaria*. *Mar. Drugs* 10, 2481–2491. <https://doi.org/10.3390/md10112481>
- Donio, M., Ronica, S., Viji, V.T., Velmurugan, S., Jenifer, J.A., Michaelbabu, M., Citarasu, T., 2013. Isolation and characterization of halophilic *Bacillus sp.* BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 6, 876–883. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60156-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60156-X)
- Duggins, D.O., Eckman, J.E., 1997. Is kelp detritus a good food for suspension feeders? Effects of kelp species, age and secondary metabolites. *Mar. Biol.* 128, 489–495. <https://doi.org/10.1007/s002270050115>

- Duggins, D.O., Simenstad, C.A., Estes, J.A., 1989. Magnification of secondary production by kelp detritus in coastal marine ecosystems. *Science* 245, 170–173.  
<https://doi.org/10.1126/science.245.4914.170>
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A.A., Melnik, A.V., Meusel, M., Dorrestein, P.C., Rousu, J., Böcker, S., 2019. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat. Methods* 16, 299–302.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>
- Dührkop, K., Nothias, L.-F., Fleischauer, M., Reher, R., Ludwig, M., Hoffmann, M.A., Petras, D., Gerwick, W.H., Rousu, J., Dorrestein, P.C., Böcker, S., 2021. Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. *Nat. Biotechnol.* 39, 462–471. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0740-8>
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., Böcker, S., 2015. Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 12580–12585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509788112>
- Dutcher, J.D., 1958. Aspergillic Acid : An antibiotic substance produced by *Aspergillus Flavus* : III. The Structure of hydroxyaspergillic acid. *J. Biol. Chem.* 232, 785–795.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77398-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77398-0)
- Dworjanyn, S.A., De Nys, R., Steinberg, P.D., 1999. Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. *Mar. Biol.* 133, 727–736.  
<https://doi.org/10.1007/s002270050514>
- Dworjanyn, S.A., Nys, R. de, Steinberg, P.D., 2006. Chemically mediated antifouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 318, 153–163.  
<https://doi.org/10.3354/meps318153>
- Egan, S., Fernandes, N.D., Kumar, V., Gardiner, M., Thomas, T., 2014. Bacterial pathogens, virulence mechanism and host defence in marine macroalgae. *Environ. Microbiol.* 16, 925–938. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12288>
- Egan, S., Gardiner, M., 2016. Microbial Dysbiosis: Rethinking Disease in Marine Ecosystems. *Front. Microbiol.* 7.
- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Thomas, T., 2013. The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 462–476. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12011>
- Egan, S., James, S., Holmström, C., Kjelleberg, S., 2002. Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environ. Microbiol.* 4, 433–442. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00322.x>
- Egan, S., Thomas, T., Kjelleberg, S., 2008. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Curr. Opin. Microbiol., Ecology and Industrial Microbiology • Techniques* 11, 219–225.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.04.001>
- Egland, K.A., Greenberg, E.P., 1999. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the luxI promoter. *Mol. Microbiol.* 31, 1197–1204. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01261.x>
- Eickhoff, M.J., Bassler, B.L., 2018. SnapShot: Bacterial quorum sensing. *Cell* 174, 1328–1328.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.003>
- Ellertsdóttir, E., Peters, A., 1997. High prevalence of infection by endophytic brown algae in populations of *Laminaria spp.* (Phaeophyceae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 146, 135–143.  
<https://doi.org/10.3354/meps146135>

- Falkowski, P.G., Barber, R.T., Smetacek, V., 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on Ocean primary production. *Science* 281, 200–207.  
<https://doi.org/10.1126/science.281.5374.200>
- Fan, B., Parrot, D., Blümel, M., Labes, A., Tasdemir, D., 2019. Influence of OSMAC-Based cultivation in metabolome and anticancer activity of fungi associated with the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Mar. Drugs* 17, 67. <https://doi.org/10.3390/md17010067>
- FAO, 2020. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2020: La durabilité an action, The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). FAO, Rome, Italy.  
<https://doi.org/10.4060/ca9229fr>
- Farrapeira, C.M.R., Tenório, D. de O., Amaral, F.D. do, 2011. Vessel biofouling as an inadvertent vector of benthic invertebrates occurring in Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 832–839. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.12.014>
- Feng, N., Ye, W., Wu, P., Huang, Y., Xie, H., Wei, X., 2007. Two new antifungal alkaloids produced by *Streptoverticillium morookaense*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 60, 179–183.  
<https://doi.org/10.1038/ja.2007.19>
- Fernandes, N., Case, R.J., Longford, S.R., Seyedsayamdost, M.R., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., Thomas, T., 2011. Genomes and virulence factors of novel bacterial pathogens causing bleaching disease in the marine red alga *Delisea pulchra*. *PLOS ONE* 6, e27387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027387>
- Fernández, C., 2011. The retreat of large brown seaweeds on the north coast of Spain: the case of *Saccorhiza polyschides*. *Eur. J. Phycol.* 46, 352–360.  
<https://doi.org/10.1080/09670262.2011.617840>
- Fernández-Bodega, M.A., Mauriz, E., Gómez, A., Martín, J.F., 2009. Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes–Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.014>
- Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A., Dragoni, I., 2001. Roquefortine C occurrence in blue cheese. *J. Food Prot.* 64, 246–251. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.2.246>
- Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J., de Nys, R., 2012. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling* 28, 649–669.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700478>
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil Pollut.* 44, 143–158. <https://doi.org/10.1007/BF00228784>
- Flewelling, A.J., Currie, J., Gray, C.A., Johnson, J.A., 2015. Endophytes from marine macroalgae: promising sources of novel natural products. *Curr. Sci.* 109, 88–111.
- Flewelling, A.J., Ellsworth, K.T., Sanford, J., Forward, E., Johnson, J.A., Gray, C.A., 2013a. Macroalgal endophytes from the atlantic coast of Canada: A potential source of antibiotic natural products? *Microorganisms* 1, 175–187.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms1010175>
- Flewelling, A.J., Johnson, J.A., Gray, C.A., 2013b. Isolation and bioassay screening of fungal endophytes from North Atlantic marine macroalgae. *Bot. Mar.* 56, 287–297.  
<https://doi.org/10.1515/bot-2012-0224>
- Florez, J.Z., Camus, C., Hengst, M.B., Buschmann, A.H., 2017. A functional perspective analysis of macroalgae and epiphytic bacterial community interaction. *Front. Microbiol.* 8, 2561. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02561>

- Førde, H., Forbord, S., Handå, A., Fossberg, J., Arff, J., Johnsen, G., Reitan, K.I., 2016. Development of bryozoan fouling on cultivated kelp (*Saccharina latissima*) in Norway. *J. Appl. Phycol.* 28, 1225–1234. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0606-5>
- Fraser, C., 2012. Is bull-kelp kelp? The role of common names in science. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 46, 279–284. <https://doi.org/10.1080/00288330.2011.621130>
- Freeman, J.A., Bassler, B., 1999. A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* 31. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01208.x>
- Fries, L., 1988. *Ascophyllum Nodosum* (phaeophyta) in axenic culture and its response to the endophytic fungus *Mycosphaerella Ascophylli* and epiphytic bacteria1. *J. Phycol.* 24, 333–337. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1988.tb04475.x>
- Fries, N., 1979. Physiological characteristics of *Mycosphaerella ascophylli*, a fungal endophyte of the marine brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Physiol. Plant.* 45, 117–121. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb01674.x>
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1983. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1301–1310. <https://doi.org/10.1128/aem.46.6.1301-1310.1983>
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269–275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- Furbino, L.E., Godinho, V.M., Santiago, I.F., Pellizari, F.M., Alves, T.M.A., Zani, C.L., Junior, P.A.S., Romanha, A.J., Carvalho, A.G.O., Gil, L.H.V.G., Rosa, C.A., Minnis, A.M., Rosa, L.H., 2014. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. *Microb. Ecol.* 67, 775–787. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0374-9>
- Gachon, C.M.M., Sime-Ngando, T., Strittmatter, M., Chambouvet, A., Kim, G.H., 2010. Algal diseases: spotlight on a black box. *Trends Plant Sci.* 15, 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.005>
- Gammone, M.A., D’Orazio, N., 2015. Anti-Obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *Mar. Drugs* 13, 2196–2214. <https://doi.org/10.3390/md13042196>
- Garbary, D.J., London, J.F., 1995. The *Ascophyllum* / Polysiphonial *Mycosphaerella* Symbiosis V. Fungal Infection Protects *A. nosodum* from Desiccation 38, 529–534. <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.529>
- Garbary, D.J., MacDonald, K.A., 1995. The *Ascophyllum* / Polysiphonia / *Mycosphaerella* Symbiosis. IV. Mutualism in the *Ascophyllum* / *Mycosphaerella* Interaction 38, 221–226. <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.221>
- García-Estrada, C., Ullán, R.V., Albillos, S.M., Fernández-Bodega, M.Á., Durek, P., von Döhren, H., Martín, J.F., 2011. A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrín in *Penicillium chrysogenum*. *Chem. Biol.* 18, 1499–1512. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.08.012>
- Gerber, N.N., Ammar, M.S., 1979. New antibiotic pigments related to fusarubin from *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. II. Structure elucidations. *J. Antibiot. (Tokyo)* 32, 685–688. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.32.685>
- Giddings, L.-A., Newman, D.J., 2015. Bioactive compounds from extremophiles, in: Giddings, L.-A., Newman, D.J. (Eds.), *Bioactive compounds from extremophiles: Genomic studies, biosynthetic gene clusters, and new dereplication methods*, SpringerBriefs in

- Microbiology. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–47.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-14836-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14836-6_1)
- Girenavar, B., Cepeda, M.L., Soni, K.A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G.K., Pillai, S.D., Patil, B.S., 2008. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 204–208.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.028>
- Godinho, V.M., Furbino, L.E., Santiago, I.F., Pellizzari, F.M., Yokoya, N.S., Pupo, D., Alves, T.M.A., Junior, P.A.S., Romanha, A.J., Zani, C.L., Cantrell, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2013. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J.* 7, 1434–1451.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.77>
- Godwin, L.S., 2003. Hull fouling of maritime vessels as a pathway for marine species invasions to the hawaiian Islands. *Biofouling* 19, 123–131.  
<https://doi.org/10.1080/0892701031000061750>
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., Imhoff, J.F., 2010. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 409, 267–299.  
<https://doi.org/10.3354/meps08607>
- Gomes, L., Monteiro, P., Cotas, J., Gonçalves, A.M.M., Fernandes, C., Gonçalves, T., Pereira, L., 2022. Seaweeds' pigments and phenolic compounds with antimicrobial potential. *Biomol. Concepts* 13, 89–102. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0003>
- Gonçalves, M.F.M., Esteves, A.C., Alves, A., 2022. Marine Fungi: Opportunities and Challenges. *Encyclopedia* 2, 559–577. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010037>
- González-Pech, R.A., Li, V.Y., Garcia, V., Boville, E., Mammone, M., Kitano, H., Ritchie, K.B., Medina, M., 2024. The evolution, assembly, and dynamics of marine holobionts. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 16, null. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-022123-104345>
- Gowrishankar, S., Pandian, S.K., Balasubramaniam, B., Balamurugan, K., 2019. Quorum quelling efficacy of marine cyclic dipeptide -cyclo(L-leucyl-L-prolyl) against the uropathogen *Serratia marcescens*. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 123, 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.013>
- Graham, L.E., Kaneko, Y., Renzaglia, K., 1991. Subcellular structures of relevance to the origin of land plants (embryophytes) from green algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 323–342.  
<https://doi.org/10.1080/07352689109382315>
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., Faure, D., 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 86–116. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038>
- Gu, Y., Yu, L., Mou, J., Wu, D., Xu, M., Zhou, P., Ren, Y., 2020. Research strategies to develop environmentally friendly marine antifouling coatings. *Mar. Drugs* 18, 371.  
<https://doi.org/10.3390/md18070371>
- Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 1541–1560.  
<https://doi.org/10.3390/ijms13021541>
- Guo, X., Liu, X., Pan, J., Yang, H., 2015. Synergistic algicidal effect and mechanism of two diketopiperazines produced by *Chryseobacterium* sp. strain GLY-1106 on the harmful bloom-forming *Microcystis aeruginosa*. *Sci. Rep.* 5, 14720.  
<https://doi.org/10.1038/srep14720>

- Gutiérrez-Barranquero, J.A., Reen, F.J., McCarthy, R.R., O’Gara, F., 2015. Deciphering the role of coumarin as a novel quorum sensing inhibitor suppressing virulence phenotypes in bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3303–3316. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6436-1>
- Hamed, A., Abdel-Razek, A.S., Araby, M., Abu-Elghait, M., El-Hosari, D.G., Frese, M., Soliman, H.S.M., Stammler, H.G., Sewald, N., Shaaban, M., 2021. Meleagrins from marine fungus *Emericella dentata* Nq45: crystal structure and diverse biological activity studies. *Nat. Prod. Res.* 35, 3830–3838. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1741583>
- Handå, A., Forbord, S., Wang, X., Broch, O.J., Dahle, S.W., Størseth, T.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., Skjermo, J., 2013. Seasonal- and depth-dependent growth of cultivated kelp (*Saccharina latissima*) in close proximity to salmon (*Salmo salar*) aquaculture in Norway. *Aquaculture* 414–415, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.006>
- Harder, T., Campbell, A.H., Egan, S., Steinberg, P.D., 2012. Chemical mediation of ternary interactions between marine holobionts and their environment as exemplified by the red alga *Delisea pulchra*. *J. Chem. Ecol.* 38, 442–450. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0119-5>
- Hardoim, C.C.P., Costa, R., 2014. Microbial communities and bioactive compounds in marine sponges of the family Irciniidae—A Review. *Mar. Drugs* 12, 5089–5122. <https://doi.org/10.3390/md12105089>
- Harvey, J.B.J., Goff, L.J., 2010. Genetic covariation of the marine fungal symbiont *Haloguignardia irritans* (Ascomycota, Pezizomycotina) with its algal hosts *Cystoseira* and *Halidrys* (Phaeophyceae, Fucales) along the west coast of North America. *Fungal Biol.* 114, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.10.009>
- Hasan, S., Ansari, M.I., Ahmad, A., Mishra, M., 2015. Major bioactive metabolites from marine fungi: A Review. *Bioinformation* 11, 176–181. <https://doi.org/10.6026/97320630011176>
- Hassani, M.A., Durán, P., Hacquard, S., 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 6, 58. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>
- Hatanaka, M., Morita, H., Aoyagi, Y., Sasaki, K., Sasaki, D., Kondo, A., Nakamura, T., 2020. Effective bifidogenic growth factors *cyclo*-Val-Leu and *cyclo*-Val-Ile produced by *Bacillus subtilis* C-3102 in the human colonic microbiota model. *Sci. Rep.* 10, 7591. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64374-w>
- Hayes, A.W., Unger, P.D., Williams, W.L., 1977. Acute Toxicity of Penicillic Acid and Rubratoxin B in Dogs. *Ann. Nutr. Aliment.* 31, 711–721.
- Hazelbauer, G.L., Lai, W.-C., 2010. Bacterial chemoreceptors: providing enhanced features to two-component signaling. *Curr. Opin. Microbiol., Cell regulation* 13, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.014>
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.* 14, 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.012>
- Henríquez, M., Vergara, K., Norambuena, J., Beiza, A., Maza, F., Ubilla, P., Araya, I., Chávez, R., San-Martín, A., Darias, J., Darias, M.J., Vaca, I., 2014. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 65–76. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1418-x>

- Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A., Schwager, S.J., 2004. Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science* 303, 226–229. <https://doi.org/10.1126/science.1091447>
- Hoffmann, M.A., Nothias, L.-F., Ludwig, M., Fleischauer, M., Gentry, E.C., Witting, M., Dorrestein, P.C., Dührkop, K., Böcker, S., 2021. Assigning confidence to structural annotations from mass spectra with COSMIC. <https://doi.org/10.1101/2021.03.18.435634>
- Hogan, D.A., Vik, Å., Kolter, R., 2004. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol. Microbiol.* 54, 1212–1223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04349.x>
- Hollants, J., Leliaert, F., De Clerck, O., Willems, A., 2013. What we can learn from sushi: a review on seaweed-bacterial associations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01446.x>
- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., Kjelleberg, S., 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41, 47–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00965.x>
- Holmström, C., James, S., Neilan, B.A., White, D.C., Kjelleberg, S., 1998. *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48, 1205–1212. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1205>
- Holmström, C., Kjelleberg, S., 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 285–293. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00656.x>
- Hong, J.-H., Jang, S., Heo, Y.M., Min, M., Lee, Hwanhwi, Lee, Y.M., Lee, Hanbyul, Kim, J.-J., 2015. Investigation of marine-derived fungal diversity and their exploitable biological activities. *Mar. Drugs* 13, 4137–4155. <https://doi.org/10.3390/md13074137>
- Huang, L., Ding, L., Li, X., Wang, N., Cui, W., Wang, X., Naman, C.B., Lazaro, J.E.H., Yan, X., He, S., 2019. New dihydroisocoumarin root growth inhibitors from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. NBUF87. *Front. Microbiol.* 10, 2846. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02846>
- Huang, L., Zhu, X., Zhou, S., Cheng, Z., Shi, K., Zhang, C., Shao, H., 2021. Phthalic acid esters: Natural sources and biological activities. *Toxins* 13, 495. <https://doi.org/10.3390/toxins13070495>
- Hugerth, L.W., Muller, E.E.L., Hu, Y.O.O., Lebrun, L.A.M., Roume, H., Lundin, D., Wilmes, P., Andersson, A.F., 2014. Systematic Design of 18S rRNA Gene Primers for Determining Eukaryotic Diversity in Microbial Consortia. *PLOS ONE* 9, e95567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095567>
- Hyde, K.D., Jones, E.B.G., Leaño, E., Pointing, S.B., Poonyth, A.D., Vrijmoed, L.L.P., 1998. Role of fungi in marine ecosystems. *Biodivers. Conserv.* 7, 1147–1161. <https://doi.org/10.1023/A:1008823515157>
- Ihua, M.W., FitzGerald, J.A., Guihéneuf, F., Jackson, S.A., Claesson, M.J., Stengel, D.B., Dobson, A.D.W., 2020. Diversity of bacteria populations associated with different thallus regions of the brown alga *Laminaria digitata*. *PLOS ONE* 15, e0242675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242675>
- Imhoff, J.F., 2016. Natural products from marine fungi—Still an underrepresented resource. *Mar. Drugs* 14, 19. <https://doi.org/10.3390/md14010019>



- Ismail, A., Ktari, L., Ahmed, M., Bolhuis, H., Boudabbous, A., Stal, L.J., Cretoiu, M.S., El Bour, M., 2016. Antimicrobial activities of bacteria associated with the brown alga *Padina pavonica*. *Front. Microbiol.* 7, 1072. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01072>
- Jamal, M.T., Satheesh, S., 2022. Antibiofilm activity of secondary metabolites of sponge-associated bacterium *Alcanivorax* sp. from the Red Sea. *Front. Mar. Sci.* 9.
- Jha, B., Kavita, K., Westphal, J., Hartmann, A., Schmitt-Kopplin, P., 2013. Quorum sensing inhibition by *Asparagopsis taxiformis*, a marine macro alga: Separation of the compound that interrupts bacterial communication. *Mar. Drugs* 11, 253–265. <https://doi.org/10.3390/md11010253>
- Jin, H., Tian, L., Bing, W., Zhao, J., Ren, L., 2022. Bioinspired marine antifouling coatings: Status, prospects, and future. *Prog. Mater. Sci.* 124, 100889. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2021.100889>
- Johnson, C.H., Ivanisevic, J., Siuzdak, G., 2016. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
- Joint, I., Tait, K., Wheeler, G., 2007. Cross-kingdom signalling: exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed *Ulva*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 1223–1233. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2047>
- Jones, E.B.G., Pang, K.-L., 2012. Marine Fungi: and Fungal-like Organisms. Walter de Gruyter.
- Joo, H.-S., Deyrup, S.T., Shim, S.H., 2021. Endophyte-produced antimicrobials: a review of potential lead compounds with a focus on quorum-sensing disruptors. *Phytochem. Rev.* 20, 543–568. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09711-7>
- Jorgensen, R., 1993. The origin of land plants: a union of alga and fungus advanced by flavonoids? *Biosystems* 31, 193–207. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(93\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0303-2647(93)90049-1)
- Julianti, E., Oh, H., Jang, K.H., Lee, J.K., Lee, S.K., Oh, D.-C., Oh, K.-B., Shin, J., 2011. Acremostriatin, a highly oxygenated metabolite from the marine fungus *Acremonium strictum*. *J. Nat. Prod.* 74, 2592–2594. <https://doi.org/10.1021/np200707y>
- Kachhadia, R., Kapadia, C., Singh, S., Gandhi, K., Jajda, H., Alfarraj, S., Ansari, M.J., Danish, S., Datta, R., 2022. Quorum sensing inhibitory and quenching activity of *Bacillus cereus* RC1 extracts on soft rot-causing bacteria *Lelliottia amnigena*. *ACS Omega* 7, 25291–25308. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02202>
- Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., T. Roembke, B., O. Sintim, H., 2013. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem. Soc. Rev.* 42, 305–341. <https://doi.org/10.1039/C2CS35206K>
- Kalivoda, E.J., Brothers, K.M., Stella, N.A., Schmitt, M.J., Shanks, R.M.Q., 2013. Bacterial cyclic AMP-Phosphodiesterase activity coordinates biofilm formation. *PLOS ONE* 8, e71267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071267>
- Kamigiri, K., Suzuki, Y., Shibazaki, M., Morioka, M., Suzuki, K.-I., Tokunaga, T., Setiawan, B., Rantiatmodjo, R.M., 1996. Kalimantacins A, B and C, novel antibiotics from *alcaligenes* sp. YL-02632S I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* 49, 136–139. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.136>
- Kanagasabhapathy, M., Yamazaki, G., Ishida, A., Sasaki, H., Nagata, S., 2009. Presence of quorum-sensing inhibitor-like compounds from bacteria isolated from the brown alga *Colpomenia sinuosa*. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 573–579. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02712.x>

- Karpiński, T.M., Adamczak, A., 2019. Fucoxanthin—An antibacterial carotenoid. *Antioxidants* 8, 239. <https://doi.org/10.3390/antiox8080239>
- Kendel, M., Couzinet-Mossion, A., Viau, M., Fleurence, J., Barnathan, G., Wielgosz-Collin, G., 2013. Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*. *J. Appl. Phycol.* 25, 425–432. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9876-3>
- Kim, G.H., Moon, K.-H., Kim, J.-Y., Shim, J., Klochkova, T., 2014. A reevaluation of algal diseases in Korean Pyropia (Porphyra) sea farms and their economic impact. *Algae* 29, 249–265.
- Kim, H.W., Wang, M., Leber, C.A., Nothias, L.-F., Reher, R., Kang, K.B., van der Hooft, J.J.J., Dorrestein, P.C., Gerwick, W.H., Cottrell, G.W., 2021. NPClassifier: A deep neural Network-Based structural classification Tool for Natural Products. *J. Nat. Prod.* 84, 2795–2807. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399>
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kizhakkepatt Kizhakkekalam, V., Chakraborty, K., Joy, M., 2020. Antibacterial and antioxidant aryl-enclosed macrocyclic polyketide from intertidal macroalgae associated heterotrophic bacterium *Shewanella algae*. *Med. Chem. Res.* 29, 145–155. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02468-5>
- KleinJan, H., Frioux, C., Califano, G., Aite, M., Fremy, E., Karimi, E., Corre, E., Wichard, T., Siegel, A., Boyen, C., Dittami, S.M., 2023. Insights into the potential for mutualistic and harmful host–microbe interactions affecting brown alga freshwater acclimation. *Mol. Ecol.* 32, 703–723. <https://doi.org/10.1111/mec.16766>
- Kloareg, B., Badis, Y., Cock, J.M., Michel, G., 2021. Role and evolution of the extracellular matrix in the acquisition of complex multicellularity in eukaryotes: A macroalgal perspective. *Genes* 12, 1059. <https://doi.org/10.3390/genes12071059>
- Koh, C.-L., Sam, C.-K., Yin, W.-F., Tan, L.Y., Krishnan, T., Chong, Y.M., Chan, K.-G., 2013. Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors* 13, 6217–6228. <https://doi.org/10.3390/s130506217>
- Kohlmeyer, J., Demoulin, V., 1981. Parasitic and symbiotic fungi on marine algae 24, 9–18. <https://doi.org/10.1515/botm.1981.24.1.9>
- Körljalg, U., Nilsson, H.R., Schigel, D., Tedersoo, L., Larsson, K.-H., May, T.W., Taylor, A.F.S., Jeppesen, T.S., Frøslev, T.G., Lindahl, B.D., Pöldmaa, K., Saar, I., Suija, A., Savchenko, A., Yatsiuk, I., Adojaan, K., Ivanov, F., Piirmann, T., Pöhönen, R., Zirk, A., Abarenkov, K., 2020. The taxon hypothesis paradigm—On the unambiguous detection and communication of taxa. *Microorganisms* 8, 1910. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121910>
- Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T.J., Marsalek, B., Feng, M., Sharma, V.K., 2020. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere* 251, 126351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>
- Kovalenko, M.I., Georgieva, M.L., Kozlovsky, V.V., Maximova, I.A., Kachalkin, A.V., Bubnova, E.N., 2023. Mycobiota of the red algae *Palmaria palmata* in the kandalaksha Gulf of the White Sea. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 78, 21–30. <https://doi.org/10.3103/S0096392523010030>
- Krumhansl, K.A., Scheibling, R.E., 2012. Production and fate of kelp detritus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 467, 281–302. <https://doi.org/10.3354/meps09940>

- Kuehl, R., Al-Bataineh, S., Gordon, O., Luginbuehl, R., Otto, M., Textor, M., Landmann, R., 2009. Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by luxS repression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4159–4166. <https://doi.org/10.1128/aac.01704-08>
- Kuhlisch, C., Pohnert, G., 2015. Metabolomics in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* 32, 937–955. <https://doi.org/10.1039/C5NP00003C>
- Kumagai, H., Nishida, H., Imamura, N., Tomoda, H., Omura, S., Bordner, J., 1990. The structures of atpenins A4, A5 and B, new antifungal antibiotics produced by *Penicillium* sp. *J. Antibiot. (Tokyo)* 43, 1553–1558. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.43.1553>
- Kumagai, Y., Shinkai, Y., Miura, T., Cho, A.K., 2012. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 221–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517>
- Kumar, V., Zozaya-Valdes, E., Kjelleberg, S., Thomas, T., Egan, S., 2016. Multiple opportunistic pathogens can cause a bleaching disease in the red seaweed *Delisea pulchra*. *Environ. Microbiol.* 18, 3962–3975. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13403>
- Lachnit, T., Blümel, M., Imhoff, J.F., Wahl, M., 2009. Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat. *Aquat. Biol.* 5, 181–186. <https://doi.org/10.3354/ab00149>
- Lachnit, T., Fischer, M., Künzel, S., Baines, J.F., Harder, T., 2013. Compounds associated with algal surfaces mediate epiphytic colonization of the marine macroalga *Fucus vesiculosus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 411–420. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12071>
- Lachnit, T., Meske, D., Wahl, M., Harder, T., Schmitz, R., 2011. Epibacterial community patterns on marine macroalgae are host-specific but temporally variable. *Environ. Microbiol.* 13, 655–665. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02371.x>
- Lachnit, T., Wahl, M., Harder, T., 2010. Isolated thallus-associated compounds from the macroalga *Fucus vesiculosus* mediate bacterial surface colonization in the field similar to that on the natural alga. *Biofouling* 26, 247–255. <https://doi.org/10.1080/08927010903474189>
- Lahti, L., Shetty, S., 2017. microbiome R package. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.microbiome>
- Lami, R., 2019. Chapter 3 - Quorum sensing in marine biofilms and environments, in: Tommonaro, G. (Ed.), *Quorum Sensing*. Academic Press, pp. 55–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814905-8.00003-4>
- Larsen, T.O., Gareis, M., Frisvad, J.C., 2002. Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary metabolite production by common penicillia on cheese agar. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6148–6152. <https://doi.org/10.1021/jf020453i>
- LaSarre, B., Federle, M.J., 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 73–111. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00046-12>
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Leclerc, J.-C., Riera, P., Leroux, C., Lévêque, L., Laurans, M., Schaal, G., Davoult, D., 2013. Trophic significance of kelps in kelp communities in Brittany (France) inferred from isotopic comparisons. *Mar. Biol.* 160, 3249–3258. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2306-5>

- Lee, H., Chang, Y.C., Nardone, G., Kwon-Chung, K.J., 2007. TUP1 disruption in *Cryptococcus neoformans* uncovers a peptide-mediated density-dependent growth phenomenon that mimics quorum sensing. *Mol. Microbiol.* 64, 591–601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05666.x>
- Lee, J.-H., Kim, Y.-G., Cho, H.S., Ryu, S.Y., Cho, M.H., Lee, J., 2014. Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 21, 1037–1042. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.04.008>
- Lee, S., Park, M.S., Lee, H., Kim, J.-J., Eimes, J.A., Lim, Y.W., 2019. Fungal diversity and enzyme activity associated with the macroalgae, *Agarum clathratum*. *Mycobiology* 47, 50–58. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1580464>
- Lee, W., Lee, S.-H., Kim, M., Moon, J.-S., Kim, G.-W., Jung, H.-G., Kim, I.H., Oh, J.E., Jung, H.E., Lee, H.K., Ku, K.B., Ahn, D.-G., Kim, S.-J., Kim, K.-S., Oh, J.-W., 2018. *Vibrio vulnificus* quorum-sensing molecule *cyclo*(Phe-Pro) inhibits RIG-I-mediated antiviral innate immunity. *Nat. Commun.* 9, 1606. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04075-1>
- Leggat, W., Ainsworth, T., Bythell, J., Dove, S., Gates, R., Hoegh-Guldberg, O., Iglesias-Prieto, R., Yellowlees, D., 2007. The hologenome theory disregards the coral holobiont. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 826–826. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635-c1>
- Lejars, M., Margaillan, A., Bressy, C., 2012. Fouling Release Coatings: A nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. *Chem. Rev.* 112, 4347–4390. <https://doi.org/10.1021/cr200350v>
- Lemay, M.A., Davis, K.M., Martone, P.T., Parfrey, L.W., 2021. Kelp-associated microbiota are structured by host anatomy. *J. Phycol.* 57, 1119–1130. <https://doi.org/10.1111/jpy.13169>
- Lenz, D.H., Mok, K.C., Lilley, B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S., Bassler, B.L., 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* 118, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.009>
- Letschert, J., Wolff, M., Kluger, L.C., Freudinger, C., Ronquillo, J., Keith, I., 2021. Uncovered pathways: Modelling dispersal dynamics of ship-mediated marine introduced species. *J. Appl. Ecol.* 58, 620–631. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13817>
- Li, L., Xu, Z., Cao, R., Li, J., Wu, C.-J., Wang, Y., Zhu, H., 2023. Effects of hydroxyl group in *cyclo*(Pro-Tyr)-like cyclic dipeptides on their anti-QS activity and self-assembly. *iScience* 26, 107048. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107048>
- Li, Q., Wang, G., 2009. Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. *Microbiol. Res.* 164, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.07.002>
- Li, S., Leung, P.H.M., Xu, X., Wu, C., 2018. Homogentisic acid  $\gamma$ -lactone suppresses the virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by quenching its quorum sensing signal molecules. *Chin. Chem. Lett., Special Issue: Functional Molecular materials* 29, 313–316. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.09.052>
- Li, X., Gong, F., Liu, D., He, S., Yuan, H., Dai, L., Cai, X., Liu, J., Guo, J., Jin, Y., Sang, F., 2019. A lotus leaf based random laser. *Org. Electron.* 69, 216–219. <https://doi.org/10.1016/j.orgel.2019.03.032>
- Lilley, B.N., Bassler, B.L., 2000. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and Sigma-54. *Mol. Microbiol.* 36, 940–954. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01913.x>
- Lin, Y.-H., Xu, J.-L., Hu, J., Wang, L.-H., Ong, S.L., Leadbetter, J.R., Zhang, L.-H., 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and

- potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* 47, 849–860.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03351.x>
- Liu, X., Yao, H., Zhao, X., Ge, C., 2023. Biofilm formation and control of foodborne pathogenic bacteria. *Molecules* 28, 2432. <https://doi.org/10.3390/molecules28062432>
- Liu, Y., Palaniveloo, K., Alias, S.A., Sathiya Seelan, J.S., 2021. Species diversity and secondary metabolites of sarcophyton-associated marine fungi. *Molecules* 26, 3227.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26113227>
- Longford, S.R., Campbell, A.H., Nielsen, S., Case, R.J., Kjelleberg, S., Steinberg, P.D., 2019. Interactions within the microbiome alter microbial interactions with host chemical defences and affect disease in a marine holobiont. *Sci. Rep.* 9, 1363.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37062-z>
- Loque, C.P., Medeiros, A.O., Pellizzari, F.M., Oliveira, E.C., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2010. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar Biol.* 33, 641–648. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0740-0>
- Lorentsen, S.-H., Sjøtun, K., Grémillet, D., 2010. Multi-trophic consequences of kelp harvest. *Biol. Conserv.* 143, 2054–2062. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.05.013>
- Lu, D.-C., Wang, F.-Q., Amann, R.I., Teeling, H., Du, Z.-J., 2023. Epiphytic common core bacteria in the microbiomes of co-located green (*Ulva*), brown (*Saccharina*) and red (*Grateloupia*, *Gelidium*) macroalgae. *Microbiome* 11, 126.  
<https://doi.org/10.1186/s40168-023-01559-1>
- Ludwig, M., Nothias, L.-F., Dührkop, K., Koester, I., Fleischauer, M., Hoffmann, M.A., Petras, D., Vargas, F., Morsy, M., Aluwihare, L., Dorrestein, P.C., Böcker, S., 2020. Database-independent molecular formula annotation using Gibbs sampling through ZODIAC. *Nat. Mach. Intell.* 2, 629–641. <https://doi.org/10.1038/s42256-020-00234-6>
- Luo, H.-Z., Zhou, J.-W., Sun, B., Jiang, H., Tang, S., Jia, A.-Q., 2021. Inhibitory effect of norharmane on *Serratia marcescens* NJ01 quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation. *Biofouling* 37, 145–160.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1874942>
- Luo, M., Zang, R., Wang, X., Chen, Z., Song, X., Ju, J., Huang, H., 2019. Natural hydroxamate-containing siderophore acremonpeptides A–D and an aluminum complex of acremonpeptide D from the marine-derived *Acremonium persicinum* SCSIO 115. *J. Nat. Prod.* 82, 2594–2600. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00545>
- Lytou, A.E., Schoina, E., Liu, Y., Michalek, K., Stanley, M.S., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2021. Quality and safety assessment of edible seaweeds *Alaria esculenta* and *Saccharina latissima* cultivated in Scotland. *Foods* 10, 2210.  
<https://doi.org/10.3390/foods10092210>
- Madsen, J.D., Chambers, P.A., James, W.F., Koch, E.W., Westlake, D.F., 2001. The interaction between water movement, sediment dynamics and submersed macrophytes. *Hydrobiologia* 444, 71–84. <https://doi.org/10.1023/A:1017520800568>
- Maiese, W.M., Korshalla, J., Goodman, J., Torrey, M.J., Kantor, S., Labeda, D.P., Greenstein, M., 1990. Simaomicin (Il-d42067), a novel antibiotic from actinomadura madurae i. Taxonomy, fermentation and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 43, 1059–1063.  
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.43.1059>
- Mallick, E.M., Bennett, R.J., 2013. Sensing of the Microbial neighborhood by *Candida albicans*. *PLOS Pathog.* 9, e1003661. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003661>
- Manfield, M., de Nys, R., Naresh, K., Roger, R., Givskov, M., Peter, S., Kjelleberg, S., 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated

- homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 145, 283–291.  
<https://doi.org/10.1099/13500872-145-2-283>
- Manefield, M., Harris, L., Rice, S.A., de Nys, R., Kjelleberg, S., 2000. Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) Pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2079–2084. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2079-2084.2000>
- Manefield, M., Rasmussen, T.B., Henzter, M., Andersen, J.B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M., 2002. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiol. Read. Engl.* 148, 1119–1127.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-1119>
- Mann, K.H., 1973. Seaweeds: Their Productivity and Strategy for Growth. *Science* 182, 975–981. <https://doi.org/10.1126/science.182.4116.975>
- Margulis, L., 1990. Words as Battle Cries: Symbiogenesis and the New Field of Endocytobiology. *BioScience* 40, 673–677. <https://doi.org/10.2307/1311435>
- Margulis, L., Fester, R., 1991. Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. MIT Press.
- Markussen Bjorbækmo, M.F., Brodie, J., Krabberød, A.K., Logares, R., Fuss, J., Fredriksen, S., Wold-Dobbe, A., Shalchian-Tabrizi, K., Bass, D., 2023. 18S rDNA gene metabarcoding of microeukaryotes and epi-endophytes in the holobiome of seven species of large brown algae. *J. Phycol.* n/a. <https://doi.org/10.1111/jpy.13377>
- Martens, T., Gram, L., Grossart, H.-P., Kessler, D., Müller, R., Simon, M., Wenzel, S.C., Brinkhoff, T., 2007. Bacteria of the Roseobacter clade show potential for secondary metabolite production. *Microb. Ecol.* 54, 31–42. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9165-2>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martin, M., Barbeyron, T., Martin, R., Portetelle, D., Michel, G., Vandenbol, M., 2015. The Cultivable surface microbiota of the brown alga *Ascophyllum nodosum* is enriched in macroalgal-polysaccharide-degrading Bacteria. *Front. Microbiol.* 6, 1487.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01487>
- Martin, S.G., 2019. Quorum sensing with pheromones. *Nat. Microbiol.* 4, 1430–1431.  
<https://doi.org/10.1038/s41564-019-0538-y>
- Matsson, S., Christie, H., Fieler, R., 2019. Variation in biomass and biofouling of kelp, *Saccharina latissima*, cultivated in the Arctic, Norway. *Aquaculture* 506, 445–452.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.068>
- Maximilien, R., Nys, R. de, Holmström, C., Gram, L., Givskov, M., Crass, K., Kjelleberg, S., Steinberg, P.D., 1998. Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquat. Microb. Ecol.* 15, 233–246. <https://doi.org/10.3354/ame015233>
- Mayer, A.M.S., Hamann, M.T., 2005. Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 140, 265–286. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.04.004>

- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. 1997, 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143, 3703–3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
- McDonough, K.A., Rodriguez, A., 2012. The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 27–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2688>
- McHugh, D.J., 2003. A guide to the seaweed industry, FAO fisheries technical paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- McKeown, D.A., Schroeder, J.L., Stevens, K., Peters, A.F., Sáez, C.A., Park, J., Rothman, M.D., Bolton, J.J., Brown, M.T., Schroeder, D.C., 2018. Phaeoviral infections are present in *Macrocytis*, *Ecklonia* and *Undaria* (Laminariales) and are influenced by wave exposure in Ectocarpales. *Viruses* 10, 410. <https://doi.org/10.3390/v10080410>
- McKeown, D.A., Stevens, K., Peters, A.F., Bond, P., Harper, G.M., Brownlee, C., Brown, M.T., Schroeder, D.C., 2017. Phaeoviruses discovered in kelp (Laminariales). *ISME J.* 11, 2869–2873. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.130>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2015. Shiny-phyloseq: Web application for interactive microbiome analysis with provenance tracking. *Bioinformatics* 31, 282–283. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu616>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Menea, F., Wijesinghe, P.A.U.I., Thiripuranathar, G., Uzair, B., Iqbal, H., Khan, B.A., Menea, B., 2020. Ecological and industrial implications of dynamic seaweed-associated microbiota interactions. *Mar. Drugs* 18, 641. <https://doi.org/10.3390/md18120641>
- Meola, M., Rifa, E., Shani, N., Delbès, C., Berthoud, H., Chassard, C., 2019. DAIRYdb: a manually curated reference database for improved taxonomy annotation of 16S rRNA gene sequences from dairy products. *BMC Genomics* 20, 560. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5914-8>
- Meyer, J.L., Gunasekera, S.P., Scott, R.M., Paul, V.J., Teplitski, M., 2016. Microbiome shifts and the inhibition of quorum sensing by Black Band Disease cyanobacteria. *ISME J.* 10, 1204–1216. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.184>
- Milledge, J.J., Smith, B., Dyer, P.W., Harvey, P., 2014. Macroalgae-derived biofuel: A review of methods of energy extraction from seaweed biomass. *Energies* 7, 7194–7222. <https://doi.org/10.3390/en7117194>
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Minich, J.J., Morris, M.M., Brown, M., Doane, M., Edwards, M.S., Michael, T.P., Dinsdale, E.A., 2018. Elevated temperature drives kelp microbiome dysbiosis, while elevated carbon dioxide induces water microbiome disruption. *PLOS ONE* 13, e0192772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192772>
- Mise, T., Ueda, M., Yasumoto, T., 2011. Production of fucoxanthin-rich powder from *Cladosiphon okamuranus*.
- Miyadera, H., Shiomi, K., Ui, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., Miyoshi, H., Osanai, A., Kita, K., Ōmura, S., 2003. Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial

- complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 473–477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237315100>
- Mohammed, A., Rivers, A., Stuckey, David.C., Ward, K., 2020. Alginate extraction from *Sargassum* seaweed in the Caribbean region: Optimization using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 245, 116419. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116419>
- Mohimani, H., Gurevich, A., Shlemov, A., Mikheenko, A., Korobeynikov, A., Cao, L., Shcherbin, E., Nothias, L.-F., Dorrestein, P.C., Pevzner, P.A., 2018. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nat. Commun.* 9, 4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>
- Molnar, J.L., Gamboa, R.L., Revenga, C., Spalding, M.D., 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front. Ecol. Environ.* 6, 485–492. <https://doi.org/10.1890/070064>
- Momose, I., Kinoshita, N., Sawa, R., Naganawa, H., Iinuma, H., Hamada, M., Takeuchi, T., 1998. Nothramicin, a new anthracycline antibiotic from *Nocardia* sp. MJ896-43F17. *J. Antibiot. (Tokyo)* 51, 130–135. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.51.130>
- Montgomery, K., Charlesworth, J.C., LeBard, R., Visscher, P.T., Burns, B.P., 2013. Quorum sensing in extreme environments. *Life* 3, 131–148. <https://doi.org/10.3390/life3010131>
- Morales, J.L., Cantillo-Ciau, Z.O., Sánchez-Molina, I., Mena-Rejón, G.J., 2006. Screening of antibacterial and antifungal activities of six marine macroalgae from coasts of Yucatán Peninsula. *Pharm. Biol.* 44, 632–635. <https://doi.org/10.1080/13880200600897569>
- Mork, M., 1996. The effect of kelp in wave damping. *Sarsia* 80, 323–327. <https://doi.org/10.1080/00364827.1996.10413607>
- Müller, R., Laepple, T., Bartsch, I., Wiencke, C., 2009. Impact of oceanic warming on the distribution of seaweeds in polar and cold-temperate waters 52, 617–638. <https://doi.org/10.1515/BOT.2009.080>
- Musthafa, K.S., Ravi, A.V., Annapoorani, A., Packiavathy, I.S.V., Pandian, S.K., 2010. Evaluation of anti-quorum-sensing activity of edible plants and fruits through inhibition of the *N*-acyl-homoserine lactone system in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* 56, 333–339. <https://doi.org/10.1159/000320185>
- Myers, O.D., Sumner, S.J., Li, S., Barnes, S., Du, X., 2017. One step forward for reducing false positive and false negative compound identifications from mass spectrometry metabolomics data: new algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks. *Anal. Chem.* 89, 8696–8703. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00947>
- Naik, D.N., Wahidullah, S., Meena, R.M., 2013. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by marine invertebrate-derived *Streptomyces* sp. *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 197–207. <https://doi.org/10.1111/lam.12034>
- Nakanishi, K., Nishijima, M., Nomoto, A.M., Yamazaki, A., Saga, N., 1999. Requisite Morphologic interaction for attachment between *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and Symbiotic Bacteria. *Mar. Biotechnol.* 1, 107–111. <https://doi.org/10.1007/PL00011744>
- Natrah, F.M.I., Kenmegne, M.M., Wiyoto, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., Defoirdt, T., 2011. Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone



- quorum sensing. *Aquaculture* 317, 53–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.038>
- Nealson, K.H., 1977. Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch. Microbiol.* 112, 73–79. <https://doi.org/10.1007/BF00446657>
- Newmister, S.A., Romminger, S., Schmidt, J.J., Williams, R.M., Smith, J.L., Berlinck, R.G.S., Sherman, D.H., 2018. Unveiling sequential late-stage methyltransferase reactions in the melegarin/oxaline biosynthetic pathway. *Org. Biomol. Chem.* 16, 6450–6459. <https://doi.org/10.1039/C8OB01565A>
- Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., Abarenkov, K., 2019. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res.* 47, D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Nixon, B.T., Ronson, C.W., Ausubel, F.M., 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 7850–7854. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7850>
- Nobori, T., Mine, A., Tsuda, K., 2018. Molecular networks in plant–pathogen holobiont. *FEBS Lett.* 592, 1937–1953. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13071>
- Noorjahan, A., Mahesh, S., Anantharaman, P., Aiyamperumal, B., 2022. Antimicrobial Potential of Seaweeds: Critical Review, in: Ranga Rao, A., Ravishankar, G.A. (Eds.), *Sustainable Global Resources Of Seaweeds Volume 1: Bioresources , Cultivation, Trade and Multifarious Applications*. Springer International Publishing, Cham, pp. 399–420. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-91955-9\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-030-91955-9_21)
- Norderhaug, K.M., Christie, H., Fosså, J.H., Fredriksen, S., 2005. fish–macrofauna interactions in a kelp (*laminaria hyperborea*) forest. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 85, 1279–1286. <https://doi.org/10.1017/S0025315405012439>
- Nosonovsky, M., Bhushan, B., 2008. *Multiscale dissipative mechanisms and hierarchical surfaces: friction, superhydrophobicity, and biomimetics*. Springer Science & Business Media.
- Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., Protsyuk, I., Ernst, M., Tsugawa, H., Fleischauer, M., Aicheler, F., Aksenov, A.A., Alka, O., Allard, P.-M., Barsch, A., Cachet, X., Caraballo-Rodriguez, A.M., Da Silva, R.R., Dang, T., Garg, N., Gauglitz, J.M., Gurevich, A., Isaac, G., Jarmusch, A.K., Kameník, Z., Kang, K.B., Kessler, N., Koester, I., Korf, A., Le Gouellec, A., Ludwig, M., Martin H., C., McCall, L.-I., McSayles, J., Meyer, S.W., Mohimani, H., Morsy, M., Moyne, O., Neumann, S., Neuweger, H., Nguyen, N.H., Nothias-Esposito, M., Paolini, J., Phelan, V.V., Pluskal, T., Quinn, R.A., Rogers, S., Shrestha, B., Tripathi, A., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Weldon, K.C., Witting, M., Yang, H., Zhang, Z., Zubeil, F., Kohlbacher, O., Böcker, S., Alexandrov, T., Bandeira, N., Wang, M., Dorrestein, P.C., 2020. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat. Methods* 17, 905–908. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>
- O’Brien, M., Nielsen, K.F., O’Kiely, P., Forristal, P.D., Fuller, H.T., Frisvad, J.C., 2006. Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9268–9276. <https://doi.org/10.1021/jf0621018>

- Ogaki, M.B., de Paula, M.T., Ruas, D., Pellizzari, F.M., García-Laviña, C.X., Rosa, L.H., 2019. Marine fungi associated with Antarctic macroalgae, in: Castro-Sowinski, S. (Ed.), *The Ecological role of micro-organisms in the Antarctic environment*, Springer Polar Sciences. Springer International Publishing, Cham, pp. 239–255.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5_11)
- Ogórek, R., Borzęcka, J., Kłosińska, K., Piecuch, A., Przymencki, M., Litwiniak, K., Suchodolski, J., 2022. A Culture-based study of Micromycetes isolated from the urban nests of Grey Heron (*Ardea cinerea*) in SW Poland. *Anim. Open Access J. MDPI* 12, 676.  
<https://doi.org/10.3390/ani12060676>
- Omae, I., 2003. General aspects of Tin-free antifouling paints. *Chem. Rev.* 103, 3431–3448.  
<https://doi.org/10.1021/cr030669z>
- Omura, S., Tomoda, H., Kimura, K., Zhent, D.-Z., Kumagai, H., Igarashi, K., Imamura, N., Takahashi, Y., Tanaka, Y., Iwai, Y., 1988. Atpenins, new antifungal antibiotics produced by *Penicillium sp.* production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* 41, 1769–1773.  
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.41.1769>
- Ono, K., Oka, R., Toyofuku, M., Sakaguchi, A., Hamada, M., Yoshida, S., Nomura, N., 2014. cAMP Signaling affects irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbes Environ.* 29, 104–106.  
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13151>
- Ophir, T., Gutnick, D.L., 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 740–745.  
<https://doi.org/10.1128/aem.60.2.740-745.1994>
- Oppliger, L.V., Correa, J.A., Engelen, A.H., Tellier, F., Vieira, V., Faugeron, S., Valero, M., Gomez, G., Destombe, C., 2012. Temperature effects on gametophyte life-history traits and geographic distribution of two cryptic kelp species. *PLOS ONE* 7, e39289.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039289>
- Othmani, A., Briand, J.-F., Ayé, M., Molmeret, M., Culioli, G., 2016a. Surface metabolites of the brown alga *Taonia atomaria* have the ability to regulate epibiosis. *Biofouling* 32, 801–813. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1198954>
- Othmani, A., Bunet, R., Bonnefont, J.-L., Briand, J.-F., Culioli, G., 2016b. Settlement inhibition of marine biofilm bacteria and barnacle larvae by compounds isolated from the Mediterranean brown alga *Taonia atomaria*. *J. Appl. Phycol.* 28, 1975–1986.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0668-4>
- Othmani, A., Molmeret, M., Blache, Y., Briand, J.F., Culioli, G., 2013. Interactions between macro-algae and associated bacteria: biofilm control by surface secondary metabolites in the Mediterranean brown seaweed *Taonia atomaria*.
- O’Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- O’Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28, 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- Padder, S.A., Prasad, R., Shah, A.H., 2018. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiol. Res.* 210, 51–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.007>
- Pagès, J., 2014. *Multiple Factor Analysis by Example Using R*. CRC Press.

- Paix, B., Carriot, N., Barry-Martinet, R., Greff, S., Misson, B., Briand, J.-F., Culioli, G., 2020. A Multi-omics analysis suggests links between the differentiated surface metabolome and epiphytic microbiota along the thallus of a Mediterranean seaweed holobiont. *Front. Microbiol.* 11, 494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00494>
- Paix, B., Layglon, N., Le Poupon, C., D’Onofrio, S., Misson, B., Garnier, C., Culioli, G., Briand, J.-F., 2021a. Integration of spatio-temporal variations of surface metabolomes and epibacterial communities highlights the importance of copper stress as a major factor shaping host-microbiota interactions within a Mediterranean seaweed holobiont. *Microbiome* 9, 201. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01124-8>
- Paix, B., Othmani, A., Debros, D., Culioli, G., Briand, J.-F., 2019. Temporal covariation of epibacterial community and surface metabolome in the Mediterranean seaweed holobiont *Taonia atomaria*. *Environ. Microbiol.* 21, 3346–3363. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14617>
- Paix, B., Vieira, C., Potin, P., Leblanc, C., De Clerck, O., Briand, J.-F., Culioli, G., 2021b. French Mediterranean and Atlantic populations of the brown algal genus *Taonia* (Dictyotales) display differences in phylogeny, surface metabolomes and epibacterial communities. *Algal Res.* 59, 102452. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102452>
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., Jermakow, K., 2020. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 1871–1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>
- Panthee, S., Kito, N., Hayashi, T., Shimizu, T., Ishikawa, J., Hamamoto, H., Osada, H., Takahashi, S., 2020.  $\beta$ -carboline chemical signals induce reveromycin production through a LuxR family regulator in *Streptomyces* sp. SN-593. *Sci. Rep.* 10, 10230. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66974-y>
- Papagianni, M., 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22, 189–259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Paquet, V., Carreira, E.M., 2006. Significant improvement of antifungal activity of polyene macrolides by bisalkylation of the mycosamine. *Org. Lett.* 8, 1807–1809. <https://doi.org/10.1021/ol060353o>
- Parasuraman, P., Devadatha, B., Sarma, V.V., Ranganathan, S., Ampasala, D.R., Reddy, D., Kumavath, R., Kim, I.-W., Patel, S.K.S., Kalia, V.C., Lee, J.-K., Siddhardha, B., 2020a. Inhibition of microbial quorum sensing mediated virulence factors by *Pestalotiopsis sydowiana* 30, 571–582. <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07030>
- Parasuraman, P., Devadatha, B., Sarma, V.V., Ranganathan, S., Ampasala, D.R., Siddhardha, B., 2020b. Anti-quorum sensing and antibiofilm activities of *Blastobotrys parvus* PPR3 against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microb. Pathog.* 138, 103811. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103811>
- Park, D.-K., Lee, K.-E., Baek, C.-H., Kim, I.H., Kwon, J.-H., Lee, W.K., Lee, K.-H., Kim, B.-S., Choi, S.-H., Kim, K.-S., 2006. Cyclo(Phe-Pro) Modulates the expression of ompU in *Vibrio* spp. *J. Bacteriol.* 188, 2214–2221. <https://doi.org/10.1128/jb.188.6.2214-2221.2006>
- Parrot, D., Antony-Babu, S., Intertaglia, L., Grube, M., Tomasi, S., Suzuki, M.T., 2015. Littoral lichens as a novel source of potentially bioactive Actinobacteria. *Sci. Rep.* 5, 15839. <https://doi.org/10.1038/srep15839>
- Parrot, D., Blümel, M., Utermann, C., Chianese, G., Krause, S., Kovalev, A., Gorb, S.N., Tasdemir, D., 2019. Mapping the surface microbiome and metabolome of brown

- seaweed *Fucus vesiculosus* by amplicon sequencing, integrated metabolomics and imaging techniques. *Sci. Rep.* 9, 1061. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37914-8>
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007>
- Pattnaik, S., Ahmed, T., Ranganathan, S.K., Ampasala, D.R., Sarma, V.V., Busi, S., 2018. *Aspergillus ochraceopetaliformis* SSP13 modulates quorum sensing regulated virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biofouling* 34, 410–425. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1460748>
- Paulitz, T., Nowak-Thompson, B., Gamard, P., Tsang, E., Loper, J., 2000. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. *J. Chem. Ecol.* 26, 1515–1524. <https://doi.org/10.1023/A:1005595927521>
- Pedersen, M., 1973. Identification of a cytokinin, 6-(3 methyl-2-butenylamino) purine, in sea water and the effect of cytokinins on brown algae. *Physiol. Plant.* 28, 101–105. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1973.tb01158.x>
- Pedersén, M., 1969. Marine brown algae requiring vitamin B12. *Physiol. Plant.* 22, 977–983. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1969.tb07455.x>
- Pedersén, M., 1968. *Ectocarpus fasciculatus*: Marine brown alga requiring kinetin. *Nature* 218, 776–776. <https://doi.org/10.1038/218776a0>
- Pei, J.-Y., Yu, W.-F., Zhang, J.-J., Kuo, T.-H., Chung, H.-H., Hu, J.-J., Hsu, C.-C., Yu, K.-F., 2022. Mass spectrometry–based metabolomic signatures of coral bleaching under thermal stress. *Anal. Bioanal. Chem.* 414, 7635–7646. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04294-y>
- Peng, Y., Li, W., 2013. A bacterial pathogen infecting gametophytes of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae). *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 31, 366–373. <https://doi.org/10.1007/s00343-013-2136-9>
- Percival, E., 1979. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *Br. Phycol. J.* 14, 103–117. <https://doi.org/10.1080/00071617900650121>
- Peteiro, C., 2018. Alginate production from marine macroalgae, with emphasis on kelp farming, in: Rehm, B.H.A., Moradali, M.F. (Eds.), *alginates and their biomedical applications*, Springer Series in Biomaterials Science and Engineering. Springer, Singapore, pp. 27–66. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6910-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6910-9_2)
- Peteiro, C., Freire, Ó., 2013. Epiphytism on blades of the edible kelps *Undaria pinnatifida* and *Saccharina latissima* farmed under different abiotic conditions. *J. World Aquac. Soc.* 44, 706–715. <https://doi.org/10.1111/jwas.12065>
- Petersen, L.-E., Marner, M., Labes, A., Tasdemir, D., 2019. Rapid metabolome and bioactivity profiling of fungi associated with the leaf and rhizosphere of the baltic seagrass *Zostera marina*. *Mar. Drugs* 17, 419. <https://doi.org/10.3390/md17070419>
- Phainuphong, P., Rukachaisirikul, V., Tadpetch, K., Sukpondma, Y., Saithong, S., Phongpaichit, S., Preedanon, S., Sakayaroj, J., 2017.  $\gamma$ -Butenolide and furanone derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG178. *Phytochemistry* 137, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.008>
- Pinhassi, J., Sala, M.M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, O., Malits, A., Marrasé, C., 2004. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6753–6766. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6753-6766.2004>

- Piola, R.F., Dafforn, K.A., Johnston, E.L., 2009. The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling* 25, 633–644.  
<https://doi.org/10.1080/08927010903063065>
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Oresic, M., 2010. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Pochon, X., Zaiko, A., Hopkins, G.A., Banks, J.C., Wood, S.A., 2015. Early detection of eukaryotic communities from marine biofilm using high-throughput sequencing: an assessment of different sampling devices. *Biofouling* 31, 241–251.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1028923>
- Potin, P., 2012. Intimate Associations Between Epiphytes, Endophytes, and Parasites of Seaweeds, in: Wiencke, C., Bischof, K. (Eds.), *Seaweed Biology: Novel Insights into Ecophysiology, Ecology and Utilization, Sur Les Études Écologiques*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 203–234. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9_11)
- Potin, P., Bouarab, K., Salaün, J.-P., Pohnert, G., Kloareg, B., 2002. Biotic interactions of marine algae. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 308–317. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00273-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00273-X)
- Poulsen, L.K., Ballard, G., Stahl, D.A., 1993. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1354–1360. <https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1354-1360.1993>
- Prasedya, E.S., Padmi, H., Ilhami, B.T.K., Martyasari, N.W.R., Sunarwidhi, A.L., Widyastuti, S., Khairinisa, M.A., Cokrowati, N., Simangunsong, E.E., Frediansyah, A., 2022. Brown Macroalgae *Sargassum cristaefolium* extract inhibits melanin production and cellular oxygen stress in b16f10 melanoma cells. *Molecules* 27, 8585.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27238585>
- Pringle, J.H., Fletcher, M., 1986. Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1321–1325. <https://doi.org/10.1128/aem.51.6.1321-1325.1986>
- Priyanka, K.R., Rajaram, R., Sivakumar, S.R., 2022. A critical review on pharmacological properties of marine macroalgae. *Biomass Convers. Biorefinery*.  
<https://doi.org/10.1007/s13399-022-03134-4>
- Proctor, C.R., McCarron, P.A., Ternan, N.G., 2020. Furanone quorum-sensing inhibitors with potential as novel therapeutics against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 69, 195–206. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001144>
- Provasoli, L., Pintner, I.J., 1980. Bacteria induced polymorphism in an axenic laboratory strain of *Ulva Lactuca* (chlorophyceae)1. *J. Phycol.* 16, 196–201.  
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1980.tb03019.x>
- Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28, 1823–1829.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts252>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Raghukumar, C., 2012. *Biology of marine fungi*. Springer Science & Business Media.
- Raghukumar, C., Ravindran, J., 2012. Fungi and their role in corals and coral reef ecosystems, in: Raghukumar, C. (Ed.), *Biology of Marine Fungi, Progress in Molecular and*

- Subcellular Biology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 89–113.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5_5)
- Rajamani, S., Bauer, W.D., Robinson, J.B., Farrow, J.M., Pesci, E.C., Teplitski, M., Gao, M., Sayre, R.T., Phillips, D.A., 2008. The vitamin riboflavin and its derivative lumichrome activate the LasR bacterial quorum-sensing receptor. *Mol. Plant-Microbe Interactions*® 21, 1184–1192. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-9-1184>
- Ransome, E., Munn, C.B., Halliday, N., Cámara, M., Tait, K., 2014. Diverse profiles of N-acyl-homoserine lactone molecules found in cnidarians. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 315–329. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12226>
- Rashmi, M., Meena, H., Meena, C., Kushveer, J.S., Busi, S., Murali, A., Sarma, V.V., 2018. Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of *Alternaria alternata*, a foliar endophyte of *Carica papaya*, evidenced by QS assays and in-silico analysis. *Fungal Biol.* 122, 998–1012. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.003>
- Rasmussen, T.B., Manefield, M., Andersen, J.B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M., 2000. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiol. Read. Engl.* 146 Pt 12, 3237–3244. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-12-3237>
- Rasmussen, T.B., Skindersoe, M.E., Bjarnsholt, T., Phipps, R.K., Christensen, K.B., Jensen, P.O., Andersen, J.B., Koch, B., Larsen, T.O., Hentzer, M., Eberl, L., Hoiby, N., Givskov, M., 2005. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* 151, 1325–1340. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27715-0>
- Raybaud, V., Beaugrand, G., Goberville, E., Delebecq, G., Destombe, C., Valero, M., Davoult, D., Morin, P., Gevaert, F., 2013. Decline in kelp in west europe and climate. *PLOS ONE* 8, e66044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066044>
- Reddy, M.M., Goossens, C., Zhou, Y., Chaib, S., Raviglione, D., Nicolè, F., Hume, B.C.C., Forcioli, D., Agostini, S., Boissin, E., Boss, E., Bowler, C., de Vargas, C., Douville, E., Flores, M., Furla, P., Galand, P.E., Gilson, E., Lombard, F., Pesant, S., Reynaud, S., Sullivan, M.B., Sunagawa, S., Troublé, R., Thurber, R.V., Wincker, P., Zoccola, D., Voolstra, C.R., Allemand, D., Planes, S., Thomas, O.P., Banaigs, B., 2023. Multi-omics determination of metabolome diversity in natural coral populations in the Pacific Ocean. *Commun. Earth Environ.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s43247-023-00942-y>
- Reen, F.J., Gutiérrez-Barranquero, J.A., Parages, M.L., O’Gara, F., 2018. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2063–2073. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8787-x>
- Reisewitz, S.E., Estes, J.A., Simenstad, C.A., 2006. Indirect food web interactions: sea otters and kelp forest fishes in the Aleutian archipelago. *Oecologia* 146, 623–631. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0230-1>
- Rickert, E., Wahl, M., Link, H., Richter, H., Pohnert, G., 2016. Seasonal variations in surface metabolite composition of *Fucus vesiculosus* and *Fucus serratus* from the Baltic sea. *PloS One* 11, e0168196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168196>
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Høiby, N., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L. 2001, 2001. N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147, 3249–3262. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-12-3249>

- Riemann, L., Steward, G.F., Azam, F., 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 578–587. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.578-587.2000>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., Cao, K.-A.L., 2017. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Comput. Biol.* 13, e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Roik, A., Reverter, M., Pogoreutz, C., 2022. A roadmap to understanding diversity and function of coral reef-associated fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, fuac028. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac028>
- Rolin, C., Inkster, R., Laing, J., McEvoy, L., 2017. Regrowth and biofouling in two species of cultivated kelp in the Shetland Islands, UK. *J. Appl. Phycol.* 29, 2351–2361. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1092-8>
- Rolland, J.L., Stien, D., Sanchez-Ferandin, S., Lami, R., 2016. Quorum sensing and quorum quenching in the phycosphere of phytoplankton: a case of chemical interactions in ecology. *J. Chem. Ecol.* 42, 1201–1211. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0791-y>
- Romani, M., Adouane, E., Carrion, C., Vecklerlé, C., Boeuf, D., Fernandez, F., Lefèvre, M., Intertaglia, L., Rodrigues, A.M.S., Lebaron, P., Lami, R., 2021. Diversity and activities of pioneer bacteria, algae, and fungi colonizing ceramic roof tiles during the first year of outdoor exposure. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 162, 105230. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105230>
- Romani, M., Carrion, C., Fernandez, F., Intertaglia, L., Pecqueur, D., Lebaron, P., Lami, R., 2019. High bacterial diversity in pioneer biofilms colonizing ceramic roof tiles. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 144, 104745. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104745>
- Römling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M., 2013. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 1–52. <https://doi.org/10.1128/mmb.00043-12>
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., Zilber-Rosenberg, I., 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 355–362. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1635>
- Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 6, 78. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9>
- Roussel, S., Caralp, C., Leblanc, C., Le Grand, F., Stiger-Pouvreau, V., Coulombet, C., Le Goïc, N., Huchette, S., 2019. Impact of nine macroalgal diets on growth and initial reproductive investment in juvenile abalone *Haliotis tuberculata*. *Aquaculture* 513, 734385. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734385>
- Ruiz, G.M., Carlton, J.T., Grosholz, E.D., Hines, A.H., 1997. Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences.1. *Am. Zool.* 37, 621–632. <https://doi.org/10.1093/icb/37.6.621>
- Rutz, A., Sorokina, M., Galgonek, J., Mietchen, D., Willighagen, E., Gaudry, A., Graham, J.G., Stephan, R., Page, R., Vondrášek, J., Steinbeck, C., Pauli, G.F., Wolfender, J.-L., Bisson, J., Allard, P.-M., 2022. The LOTUS initiative for open knowledge management in natural products research. *eLife* 11, e70780. <https://doi.org/10.7554/eLife.70780>
- Saha, M., Rempt, M., Grosser, K., Pohnert, G., Weinberger, F., 2011. Surface-associated fucoxanthin mediates settlement of bacterial epiphytes on the rockweed *Fucus vesiculosus*. *Biofouling* 27, 423–433. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.580841>

- Saha, M., Wahl, M., 2013. Seasonal variation in the antifouling defence of the temperate brown alga *Fucus vesiculosus*. *Biofouling* 29, 661–668.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2013.795953>
- Saha, M., Weinberger, F., 2019. Microbial “gardening” by a seaweed holobiont: Surface metabolites attract protective and deter pathogenic epibacterial settlement. *J. Ecol.* 107, 2255–2265. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13193>
- Salaün, S., La Barre, S., Santos-Goncalvez, M.D., Potin, P., Haras, D., Bazire, A., 2012. Influence of exudates of the kelp *Laminaria Digitata* on biofilm formation of associated and exogenous bacterial epiphytes. *Microb. Ecol.* 64, 359–369.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-012-0048-4>
- Sánchez, A., Vázquez, A., 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Qual. Saf.* 1, 29–46.  
<https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>
- Sánchez Hinojosa, V., Asenjo, J., Leiva, S., 2018. Agarolytic culturable bacteria associated with three antarctic subtidal macroalgae. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 73.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2456-1>
- Sanderson, J.C., Dring, M.J., Davidson, K., Kelly, M.S., 2012. Culture, yield and bioremediation potential of *Palmaria palmata* (Linnaeus) Weber & Mohr and *Saccharina latissima* (Linnaeus) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders adjacent to fish farm cages in northwest Scotland. *Aquaculture* 354–355, 128–135.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.019>
- Sarasan, M., Puthumana, J., Job, N., Han, J., Lee, J.-S., Philip, R., 2017. Marine algicolous endophytic fungi - a promising drug resource of the Era. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1039–1052. <https://doi.org/10.4014/jmb.1701.01036>
- Sasaki, Y., Yoshikuni, Y., 2022. Metabolic engineering for valorization of macroalgae biomass. *Metab. Eng.* 71, 42–61. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.01.005>
- Satheesh, S., Ba-akdah, M.A., Al-Sofyani, A.A., 2016. Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms: A review. *Electron. J. Biotechnol.* 19, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.002>
- Saurav, K., Borbone, N., Burgsdorf, I., Teta, R., Caso, A., Bar-Shalom, R., Esposito, G., Britstein, M., Steindler, L., Costantino, V., 2020. Identification of quorum sensing activators and inhibitors in the marine sponge *Sarcotragus spinosulus*. *Mar. Drugs* 18, 127. <https://doi.org/10.3390/md18020127>
- Saurav, K., Costantino, V., Venturi, V., Steindler, L., 2017. Quorum sensing inhibitors from the sea discovered using bacterial *N*-acyl-homoserine lactone-based biosensors. *Mar. Drugs* 15, 53. <https://doi.org/10.3390/md15030053>
- Sawabe, Tomoo., Makino, Hideyuki., Tatsumi, Masahiro., Nakano, Kazuaki., Tajima, Kenichi., Iqbal, M.Mahbub., Yumoto, Isao., Ezura, Yoshio., Christen, Richard., 1998. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48, 769–774. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-769>
- Schiel, D., Lilley, S., 2007. Gradients of disturbance to an algal canopy and the modification of an intertidal community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 339, 1–11.  
<https://doi.org/10.3354/meps339001>
- Schiel, D.R., Foster, M.S., 2015. *The biology and ecology of giant kelp forests*. Univ of California Press.
- Schiel, D.R., Foster, M.S., 2006. *The population biology of large brown seaweeds: ecological consequences of multiphase life histories in dynamic coastal environments*. Annu.



- Rev. Ecol. Evol. Syst. 37, 343–372.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110251>
- Schiel, D.R., Lilley, S.A., 2007. Gradients of disturbance to an algal canopy and the modification of an intertidal community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 339, 1–11.  
<https://doi.org/10.3354/meps339001>
- Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrland, T.S., Bushuev, R., Murray, K.J., Hoffmann, N., Lu, M., Sarvepalli, A., Zhang, Z., Fleischauer, M., Dührkop, K., Wesner, M., Hoogstra, S.J., Rudt, E., Mokshyna, O., Brungs, C., Ponomarov, K., Mutabdžija, L., Damiani, T., Pudney, C.J., Earll, M., Helmer, P.O., Fallon, T.R., Schulze, T., Rivas-Ubach, A., Bilbao, A., Richter, H., Nothias, L.-F., Wang, M., Orešič, M., Weng, J.-K., Böcker, S., Jeibmann, A., Hayen, H., Karst, U., Dorrestein, P.C., Petras, D., Du, X., Pluskal, T., 2023. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nat. Biotechnol.* 41, 447–449. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2>
- Schmid, S., Ranz, D., He, M., Burkard, S., Lukowicz, M.V., Reiter, R., Arnold, R., Deit, H.L., David, M., Rambeck, W., 2003. Marine algae as natural source of iodine in the feeding of freshwater fish: a new possibility to improve iodine supply of man. *Rev. Med. Veterinaire.*
- Schroeder, D.C., Mckeown, D.A., 2021. Viruses of seaweeds, in: *Studies in Viral Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 121–138. <https://doi.org/10.1002/9781119608370.ch4>
- Schultz, M.P., 2007. Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. *Biofouling* 23, 331–341. <https://doi.org/10.1080/08927010701461974>
- Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R., Hertel, W.M., 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* 27, 87–98.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2010.542809>
- Schultze, K., Janke, K., Krüß, A., Weidemann, W., 1990. The macrofauna and macroflora associated with *Laminaria digitata* and *L. hyperborea* at the island of Helgoland (German Bight, North Sea). *Helgoländer Meeresunters.* 44, 39–51.  
<https://doi.org/10.1007/BF02365430>
- Schultz-Johansen, M., Stougaard, P., Svensson, B., Teze, D., 2021. Two marine GH29  $\alpha$ -L-fucosidases from an uncultured *Paraglaciecola* sp. specifically hydrolyze fucosyl-N-acetylglucosamine regioisomers. <https://doi.org/10.1101/2021.06.01.446583>
- Schulz, S., 2014. A new bacterial chemical signal: mapping the chemical space used for communication. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 15, 498–500.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.201300758>
- Schütz, C., Empting, M., 2018. Targeting the Pseudomonas quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers. *Beilstein J. Org. Chem.* 14, 2627–2645. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.241>
- Schwartz, N., Dobretsov, S., Rohde, S., Schupp, P.J., 2017. Comparison of antifouling properties of native and invasive Sargassum (Fucales, Phaeophyceae) species. *Eur. J. Phycol.* 52, 116–131. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1231345>
- Sethupathy, S., Shanmuganathan, B., Kasi, P.D., Karutha Pandian, S., 2016. Alpha-bisabolol from brown macroalga *Padina gymnospora* mitigates biofilm formation and quorum sensing controlled virulence factor production in *Serratia marcescens*. *J. Appl. Phycol.* 28, 1987–1996. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0717-z>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated

- models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Sharmila, G.V., Kumar, M.D., Pugazhendi, A., Bajhaiya, A.K., Gugulothu, P., J, R.B., 2021. Biofuel production from macroalgae: present scenario and future scope. *Bioengineered* 12, 9216–9238. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1996019>
- Shen, W., Le, S., Li, Y., Hu, F., 2016. SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation. *PLOS ONE* 11, e0163962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>
- Shnit-Orland, M., Sivan, A., Kushmaro, A., 2012. Antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* in the Coral Holobiont. *Microb. Ecol.* 64, 851–859. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0086-y>
- Shucksmith, R.J., Shelmerdine, R.L., 2015. A risk based approach to non-native species management and biosecurity planning. *Mar. Policy* 59, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2015.05.001>
- Silber, J., Kramer, A., Labes, A., Tasdemir, D., 2016. From discovery to production: biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics. *Mar. Drugs* 14, 137. <https://doi.org/10.3390/md14070137>
- Silkina, A., Bazes, A., Mouget, J.-L., Bourgougnon, N., 2012. Comparative efficiency of macroalgal extracts and booster biocides as antifouling agents to control growth of three diatom species. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2039–2046. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.06.028>
- Singh, R.P., Baghel, R.S., Reddy, C.R.K., Jha, B., 2015. Effect of quorum sensing signals produced by seaweed-associated bacteria on carpospore liberation from *Gracilaria dura*. *Front. Plant Sci.* 6, 117. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00117>
- Singh, R.P., Mantri, V.A., Reddy, C.R.K., Jha, B., 2011. Isolation of seaweed-associated bacteria and their morphogenesis-inducing capability in axenic cultures of the green alga *Ulva fasciata*. *Aquat. Biol.* 12, 13–21. <https://doi.org/10.3354/ab00312>
- Singh, R.P., Reddy, C.R.K., 2016. Unraveling the Functions of the Macroalgal Microbiome. *Front. Microbiol.* 6, 1488. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01488>
- Skindersoe, M.E., Ettinger-Epstein, P., Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., de Nys, R., Givskov, M., 2008. Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar. Biotechnol.* 10, 56–63. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9036-y>
- Smale, D.A., Burrows, M.T., Evans, A.J., King, N., Sayer, M.D.J., Yunnice, A.L.E., Moore, P.J., 2016. Linking environmental variables with regional-scale variability in ecological structure and standing stock of carbon within UK kelp forests. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 542, 79–95. <https://doi.org/10.3354/meps11544>
- Smit, A.J., 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.* 16, 245–262. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000047783.36600.ef>
- Soares, C., Švarc-Gajić, J., Oliva-Teles, M.T., Pinto, E., Nastić, N., Savić, S., Almeida, A., Delerue-Matos, C., 2020. Mineral composition of subcritical water extracts of *Saccorhiza polyschides*, a brown seaweed used as fertilizer in the north of Portugal. *J. Mar. Sci. Eng.* 8, 244. <https://doi.org/10.3390/jmse8040244>
- Spiteller, P., 2015. Chemical ecology of fungi. *Nat. Prod. Rep.* 32, 971–993. <https://doi.org/10.1039/C4NP00166D>
- Spoerner, M., Wichard, T., Bachhuber, T., Stratmann, J., Oertel, W., 2012. Growth and thallus morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) depends on a combination of two

- bacterial species excreting regulatory factors. *J. Phycol.* 48, 1433–1447.  
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01231.x>
- Staden, R., Judge, D.P., Bonfield, J.K., 2003. Analyzing sequences using the staden package and EMBOSS, in: Krawetz, S.A., Womble, D.D. (Eds.), *Introduction to Bioinformatics: A Theoretical and Practical Approach*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 393–410.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59259-335-4\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-335-4_24)
- Staufenberger, T., Thiel, V., Wiese, J., Imhoff, J.F., 2008. Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 65–77.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00445.x>
- Steinberg, P.D., De Nys, R., 2002. Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. *J. Phycol.* 38, 621–629. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.02042.x>
- Steneck, R.S., Graham, M.H., Bourque, B.J., Corbett, D., Erlandson, J.M., Estes, J.A., Tegner, M.J., 2002. Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Environ. Conserv.* 29, 436–459. <https://doi.org/10.1017/S0376892902000322>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40, 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Stewart, M., Depree, C., Thompson, K.J., 2009. Antifouling sesterterpenes from the new Zealand marine sponge *Semitaspongia Bactriana*. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1934578X0900400306. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400306>
- Stewart, M., Miles, W.H., Depree, C., 2014. Antifouling activity of synthetic  $\gamma$ -hydroxybutenolides. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 88, 176–184.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.019>
- Steyn, P.S., 1970. The isolation, structure and absolute configuration of secalononic acid D, the toxic metabolite of *Penicillium oxalicum*. *Tetrahedron* 26, 51–57.  
[https://doi.org/10.1016/0040-4020\(70\)85006-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(70)85006-2)
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N., 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 183–215.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Strain, E.M.A., Thomson, R.J., Micheli, F., Mancuso, F.P., Airoldi, L., 2014. Identifying the interacting roles of stressors in driving the global loss of canopy-forming to mat-forming algae in marine ecosystems. *Glob. Change Biol.* 20, 3300–3312.  
<https://doi.org/10.1111/gcb.12619>
- Stratil, S.B., Neulinger, S.C., Knecht, H., Friedrichs, A.K., Wahl, M., 2014. Salinity affects compositional traits of epibacterial communities on the brown macroalga *Fucus vesiculosus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 272–279. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12292>
- Stratil, S.B., Neulinger, S.C., Knecht, H., Friedrichs, A.K., Wahl, M., 2013. Temperature-driven shifts in the epibiotic bacterial community composition of the brown macroalga *Fucus vesiculosus*. *MicrobiologyOpen* 2, 338–349. <https://doi.org/10.1002/mbo3.79>
- Sugiyama, A., 2021. Flavonoids and saponins in plant rhizospheres: roles, dynamics, and the potential for agriculture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85, 1919–1931.  
<https://doi.org/10.1093/bbb/zbab106>
- Sun, S., Dai, X., Sun, J., Bu, X., Weng, C., Li, H., Zhu, H., 2016. A diketopiperazine factor from *Rheinheimera aquimaris* QSI02 exhibits anti-quorum sensing activity. *Sci. Rep.* 6, 39637. <https://doi.org/10.1038/srep39637>

- Sun, S.-J., Liu, Y.-C., Weng, C.-H., Sun, S.-W., Li, F., Li, H., Zhu, H., 2020. Cyclic dipeptides mediating quorum sensing and their biological effects in *Hypsizygus Marmoreus*. *Biomolecules* 10, 298. <https://doi.org/10.3390/biom10020298>
- Suryanarayanan, T.S., 2012. Fungal endosymbionts of seaweeds, in: Raghukumar, c. (ed.), *biology of marine fungi, progress in molecular and subcellular biology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 53–69. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5_3)
- Suttle, C.A., 2007. Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 801–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
- Suttle, C.A., 2005. Viruses in the sea. *Nature* 437, 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature04160>
- Suzuki, M.T., Parrot, D., Berg, G., Grube, M., Tomasi, S., 2016. Lichens as natural sources of biotechnologically relevant bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 583–595. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7114-z>
- Suzuki, S., Furuya, K., Kawai, T., Takeuchi, I., 2007. Growth and annual production of the brown alga *Laminaria religiosa* introduced into the Uwa Sea in southern Japan. *Phycol. Res.* 55, 272–277. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2007.00471.x>
- Szurmant, H., Ordal, G.W., 2004. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 301–319. <https://doi.org/10.1128/mmb.68.2.301-319.2004>
- Tait, K., Hutchison, Z., Thompson, F.L., Munn, C.B., 2010. Quorum sensing signal production and inhibition by coral-associated vibrios. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 145–150. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00122.x>
- Tait, K., Joint, I., Daykin, M., Milton, D.L., Williams, P., Cámara, M., 2005. Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms. *Environ. Microbiol.* 7, 229–240. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00706.x>
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tapia, J.E., González, B., Goulitquer, S., Potin, P., Correa, J.A., 2016. Microbiota influences morphology and reproduction of the brown alga *Ectocarpus sp.* *Front. Microbiol.* 7, 197. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00197>
- Tarquinio, F., Hyndes, G.A., Laverock, B., Koenders, A., Sävström, C., 2019. The seagrass holobiont: understanding seagrass-bacteria interactions and their role in seagrass ecosystem functioning. *FEMS Microbiol. Lett.* 366, fnz057. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz057>
- Taylor, B.F., Visscher, P.T., 1996. Metabolic Pathways Involved in DMSP Degradation, in: Kiene, R.P., Visscher, P.T., Keller, M.D., Kirst, G.O. (Eds.), *Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds*. Springer US, Boston, MA, pp. 265–276. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0377-0\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0377-0_23)
- Taylor, M.W., Schupp, P.J., Baillie, H.J., Charlton, T.S., de Nys, R., Kjelleberg, S., Steinberg, P.D., 2004. Evidence for acyl homoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4387–4389. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4387-4389.2004>
- Tello, E., Castellanos, L., Arevalo-Ferro, C., Rodríguez, J., Jiménez, C., Duque, C., 2011. Absolute stereochemistry of antifouling cembranoid epimers at C-8 from the

- Caribbean octocoral *Pseudoplexaura flagellosa*. Revised structures of plexauroloones. *Tetrahedron* 67, 9112–9121. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.09.094>
- Theis, K.R., Dheilly, N.M., Klassen, J.L., Brucker, R.M., Baines, J.F., Bosch, T.C.G., Cryan, J.F., Gilbert, S.F., Goodnight, C.J., Lloyd, E.A., Sapp, J., Vandenkoornhuys, P., Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., Bordenstein, S.R., 2016. Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems* 1, e00028-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00028-16>
- Thiyagarajan, V., Harder, T., Qiu, J.-W., Qian, P.-Y., 2004. Energy content at metamorphosis and growth rate of the early juvenile barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar. Biol.* 144, 619–621. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1262-x>
- Thomas, F., Dittami, S.M., Brunet, M., Le Duff, N., Tanguy, G., Leblanc, C., Gobet, A., 2020. Evaluation of a new primer combination to minimize plastid contamination in 16S rDNA metabarcoding analyses of alga-associated bacterial communities. *Environ. Microbiol. Rep.* 12, 30–37. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12806>
- Thomas, K.V., Brooks, S., 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling* 26, 73–88. <https://doi.org/10.1080/08927010903216564>
- Thompson, J.R., Rivera, H.E., Closek, C.J., Medina, M., 2015. Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.
- Tintillier, F., Moriou, C., Petek, S., Fauchon, M., Hellio, C., Saulnier, D., Ekins, M., Hooper, J.N.A., Al-Mourabit, A., Debitus, C., 2020. Quorum sensing inhibitory and antifouling activities of new bromotyrosine metabolites from the Polynesian sponge *Pseudoceratina n. sp.* *Mar. Drugs* 18, 272. <https://doi.org/10.3390/md18050272>
- Tofan, A., 2012. La patuline et sa toxicité sur l'organisme humain.
- Tourneroche, A., Lami, R., Burgaud, G., Domart-Coulon, I., Li, W., Gachon, C., Gèze, M., Boeuf, D., Prado, S., 2020. The bacterial and fungal microbiota of *Saccharina latissima* (Laminariales, Phaeophyceae). *Front. Mar. Sci.* 7.
- Tourneroche, A., Lami, R., Hubas, C., Blanchet, E., Vallet, M., Escoubeyrou, K., Paris, A., Prado, S., 2019. Bacterial–fungal interactions in the kelp endomicrobiota drive autoinducer-2 quorum sensing. *Front. Microbiol.* 10, 1693. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01693>
- Uchida, M., Murata, M., 2004. Isolation of a lactic acid bacterium and yeast consortium from a fermented material of *Ulva* spp. (Chlorophyta). *J. Appl. Microbiol.* 97, 1297–1310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02425.x>
- Uher, E., Compère, C., Combe, M., Mazeas, F., Gourlay-Francé, C., 2017. In situ measurement with diffusive gradients in thin films: effect of biofouling in freshwater. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 13797–13807. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8972-y>
- Upmanyu, K., Haq, Q.Mohd.R., Singh, R., 2022. Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: Opportunities for developing therapeutics. *Curr. Res. Microb. Sci.* 3, 100131. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100131>
- Uroz, S., Oger, P.M., Chapelle, E., Adeline, M.-T., Faure, D., Dessaux, Y., 2008. A *Rhodococcus* *qsD*-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1357–1366. <https://doi.org/10.1128/AEM.02014-07>
- Vairappan, C.S., Suzuki, M., Motomura, T., Ichimura, T., 2001. Pathogenic bacteria associated with lesions and thallus bleaching symptoms in the Japanese kelp *Laminaria religiosa*

- Miyabe* (Laminariales, Phaeophyceae). *Hydrobiologia* 445, 183–191.  
<https://doi.org/10.1023/A:1017517832302>
- Valentini, M., Filloux, A., 2016. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria \*. *J. Biol. Chem.* 291, 12547–12555.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>
- Vallet, M., Chong, Y.-M., Tourneroc, A., Genta-Jouve, G., Hubas, C., Lami, R., Gachon, C.M.M., Klochkova, T., Chan, K.-G., Prado, S., 2020. Novel  $\alpha$ -Hydroxy  $\gamma$ -Butenolides of kelp endophytes disrupt bacterial cell-to-cell signaling. *Front. Mar. Sci.* 7.
- Vallet, M., Strittmatter, M., Murúa, P., Lacoste, S., Dupont, J., Hubas, C., Genta-Jouve, G., Gachon, C.M.M., Kim, G.H., Prado, S., 2018. Chemically-mediated interactions between macroalgae, their fungal endophytes, and protistan pathogens. *Front. Microbiol.* 9, 3161. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03161>
- Van Alstyne, K., Wolfe, G., Freidenburg, T., Neill, A., Hicken, C., 2001. Activated defense systems in marine macroalgae: evidence for an ecological role for DMSP cleavage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 213, 53–65. <https://doi.org/10.3354/meps213053>
- Van Alstyne, K.L., Puglisi, M.P., 2007. DMSP in marine macroalgae and macroinvertebrates: distribution, function, and ecological impacts. *Aquat. Sci.* 69, 394–402.  
<https://doi.org/10.1007/s00027-007-0888-z>
- van de Water, J.A.J.M., Allemand, D., Ferrier-Pagès, C., 2018. Host-microbe interactions in octocoral holobionts - recent advances and perspectives. *Microbiome* 6, 64.  
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0431-6>
- van der Wal, A., Geydan, T.D., Kuyper, T.W., de Boer, W., 2013. A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 477–494. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12001>
- van Santen, J.A., Jacob, G., Singh, A.L., Aniebok, V., Balunas, M.J., Bunsko, D., Neto, F.C., Castaño-Espriu, L., Chang, C., Clark, T.N., Cleary Little, J.L., Delgadillo, D.A., Dorrestein, P.C., Duncan, K.R., Egan, J.M., Galey, M.M., Haeckl, F.P.J., Hua, A., Hughes, A.H., Iskakova, D., Khadilkar, A., Lee, J.-H., Lee, S., LeGrow, N., Liu, D.Y., Macho, J.M., McCaughey, C.S., Medema, M.H., Neupane, R.P., O'Donnell, T.J., Paula, J.S., Sanchez, L.M., Shaikh, A.F., Soldatou, S., Terlouw, B.R., Tran, T.A., Valentine, M., van der Hooft, J.J.J., Vo, D.A., Wang, M., Wilson, D., Zink, K.E., Lington, R.G., 2019. The Natural Products Atlas: An open access knowledge base for microbial natural products discovery. *ACS Cent. Sci.* 5, 1824–1833.  
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00806>
- van Santen, J.A., Poynton, E.F., Iskakova, D., McMann, E., Alsup, T.A., Clark, T.N., Fergusson, C.H., Fewer, D.P., Hughes, A.H., McCadden, C.A., Parra, J., Soldatou, S., Rudolf, J.D., Jansen, E.M.-L., Duncan, K.R., Lington, R.G., 2022. The Natural Products Atlas 2.0: a database of microbially-derived natural products. *Nucleic Acids Res.* 50, D1317–D1323. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab941>
- Viano, Y., Bonhomme, D., Camps, M., Briand, J.-F., Ortalo-Magné, A., Blache, Y., Piovetti, L., Culioli, G., 2009. Diterpenoids from the mediterranean brown alga *Dictyota* sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm. *J. Nat. Prod.* 72, 1299–1304. <https://doi.org/10.1021/np900102f>
- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G.K., Pillai, B.S., Patil, B.S., 2010. Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.012>

- Vivekanand, V., Eijsink, V.G.H., Horn, S.J., 2012. Biogas production from the brown seaweed *Saccharina latissima*: thermal pretreatment and codigestion with wheat straw. *J. Appl. Phycol.* 24, 1295–1301. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9779-8>
- Wadhams, G.H., Armitage, J.P., 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 1024–1037. <https://doi.org/10.1038/nrm1524>
- Wahl, M., Goecke, F., Labes, A., Dobretsov, S., Weinberger, F., 2012. The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. *Front. Microbiol.* 3.
- Wahl, M., Shahnaz, L., Dobretsov, S., Saha, M., Symanowski, F., David, K., Lachnit, T., Vasel, M., Weinberger, F., 2010. Ecology of antifouling resistance in the bladder wrack *Fucus vesiculosus*: patterns of microfouling and antimicrobial protection. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 411, 33–48. <https://doi.org/10.3354/meps08644>
- Waldock, M.J., Thain, J.E., 1983. Shell thickening in *Crassostrea gigas*: Organotin antifouling or sediment induced? *Mar. Pollut. Bull.* 14, 411–415. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(83\)90445-9](https://doi.org/10.1016/0025-326X(83)90445-9)
- Wang, D., Kim, D.H., Kim, K.H., 2016. Effective production of fermentable sugars from brown macroalgae biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9439–9450. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7857-1>
- Wang, F.-W., 2012. Bioactive metabolites from *Guignardia sp.*, an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. *Chin. J. Nat. Med.* 10, 72–76. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(12\)60016-8](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(12)60016-8)
- Wang, L., Dong, J.Y., Song, H.-C., Shen, K.Z., Wang, L.M., Sun, R., Wang, C.R., Gao, Y.X., Li, G.H., Li, L., Zhang, K.Q., 2009. Three new naphthoquinone pigments isolated from the freshwater fungus, *Astrosphaeriella papuana*. *Planta Med.* 75, 1339–1343. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185684>
- Wang, L., English, M.K., Tomas, F., Mueller, R.S., 2021. Recovery and community succession of the *Zostera marina* rhizobiome after transplantation. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e02326-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02326-20>
- Wang, L., Zou, S., Yin, S., Liu, H., Yu, W., Gong, Q., 2011. Construction of an effective screening system for detection of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors and its application in bioautographic thin-layer chromatography. *Biotechnol. Lett.* 33, 1381–1387. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0563-2>
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapon, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrew, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., Boya P, C.A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T.,

- Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.Ø., Pogliano, K., Lington, R.G., Gutiérrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Bandeira, N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* 34, 828–837.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wang, M., Zhao, L., Wu, H., Zhao, C., Gong, Q., Yu, W., 2020. Cladodionen is a potential quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*. *Mar. Drugs* 18, 205.  
<https://doi.org/10.3390/md18040205>
- Wang, Q.-X., Bao, L., Yang, X.-L., Guo, H., Yang, R.-N., Ren, B., Zhang, L.-X., Dai, H.-Q., Guo, L.-D., Liu, H.-W., 2012. Polyketides with antimicrobial activity from the solid culture of an endolichenic fungus *Ulocladium sp.* *Fitoterapia* 83, 209–214.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.10.013>
- Wang, W., Li, X., Liang, G., Zhao, N., Shi, L., Yang, G., 2021. Description of a white spot disease of field cultivated kelp (*Saccharina japonica*) and evaluation of its influences on the growth and phytochemical contents. *Aquat. Bot.* 173, 103414.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2021.103414>
- Wang, Y., Pan, L., Li, L., Cao, R., Zheng, Q., Xu, Z., Wu, C.-J., Zhu, H., 2022a. Glycosylation increases the anti-QS as well as anti-biofilm and anti-adhesion ability of the *cyclo* (L-Trp-L-Ser) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Med. Chem.* 238, 114457.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114457>
- Wang, Y., Zheng, Q., Li, L., Pan, L., Zhu, H., 2022b. Anti-quorum-sensing activity of tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Mar. Drugs* 20, 85.  
<https://doi.org/10.3390/md20020085>
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Weigel, B.L., Miranda, K.K., Fogarty, E.C., Watson, A.R., Pfister, C.A., 2022. Functional insights into the kelp microbiome from metagenome-assembled genomes. *mSystems* 7, e01422-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.01422-21>
- Weinberger, F., 2007. Pathogen-induced defense and innate immunity in macroalgae. *Biol. Bull.* 213, 290–302. <https://doi.org/10.2307/25066646>
- Wen, L., Weaver, J.C., Lauder, G.V., 2014. Biomimetic shark skin: design, fabrication and hydrodynamic function. *J. Exp. Biol.* 217, 1656–1666.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.097097>
- Wernberg, T., Thomsen, M.S., Tuya, F., Kendrick, G.A., Staehr, P.A., Toohey, B.D., 2010. Decreasing resilience of kelp beds along a latitudinal temperature gradient: potential implications for a warmer future. *Ecol. Lett.* 13, 685–694.  
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01466.x>
- Wheeler, G.L., Tait, K., Taylor, A., Brownlee, C., Joint, I., 2006. Acyl-homoserine lactones modulate the settlement rate of zoospores of the marine alga *Ulva intestinalis* via a novel chemokinetic mechanism. *Plant Cell Environ.* 29, 608–618.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01440.x>
- Whiteley, M., Diggle, S.P., Greenberg, E.P., 2017. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551, 313–320.  
<https://doi.org/10.1038/nature24624>



- Wichard, T., 2023. From model organism to application: Bacteria-induced growth and development of the green seaweed *Ulva* and the potential of microbe leveraging in algal aquaculture. *Semin. Cell Dev. Biol.*, Special Issue: Algal model organisms by Susana Coelho and Olivier de Clerck 134, 69–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.04.007>
- Wiese, J., Imhoff, J.F., 2019. Marine bacteria and fungi as promising source for new antibiotics. *Drug Dev. Res.* 80, 24–27. <https://doi.org/10.1002/ddr.21482>
- Wiese, J., Thiel, V., Nagel, K., Staufenberg, T., Imhoff, J.F., 2009a. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Mar. Biotechnol.* N. Y. N 11, 287–300. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9143-4>
- Wiese, J., Thiel, V., Nagel, K., Staufenberg, T., Imhoff, J.F., 2009b. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Mar. Biotechnol.* 11, 287–300. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9143-4>
- Williams, P., 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153, 3923–3938.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012856-0>
- Williams, S.L., Smith, J.E., 2007. A Global review of the distribution, taxonomy, and impacts of introduced seaweeds. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 327–359.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095543>
- Wongsuk, T., Pumeesat, P., Luplertlop, N., 2016. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* 56, 440–447.  
<https://doi.org/10.1002/jobm.201500759>
- Wood, D.E., Lu, J., Langmead, B., 2019. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 20, 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wright, J.T., de Nys, R., Poore, A.G.B., Steinberg, P.D., 2004. Chemical defense in a marine alga: heritability and the potential for selection by herbivores. *Ecology* 85, 2946–2959. <https://doi.org/10.1890/03-4041>
- Wright, J.T., Nys, R. de, Steinberg, P.D., 2000. Geographic variation in halogenated furanones from the red alga *Delisea pulchra* and associated herbivores and epiphytes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 207, 227–241. <https://doi.org/10.3354/meps207227>
- Wu, G., Sun, X., Yu, G., Wang, W., Zhu, T., Gu, Q., Li, D., 2014. Cladosins A–E, Hybrid polyketides from a deep-sea-derived fungus, *Cladosporium sphaerospermum*. *J. Nat. Prod.* 77, 270–275. <https://doi.org/10.1021/np400833x>
- Xiao, F., Goodwin, S.M., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, M.A., Zhou, J.-M., 2004. *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J.* 23, 2903–2913.  
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600290>
- Xiao, H., Zhao, J., Fang, C., Cao, Q., Xing, M., Li, X., Hou, J., Ji, A., Song, S., 2020. Advances in studies on the pharmacological activities of fucoxanthin. *Mar. Drugs* 18, 634.  
<https://doi.org/10.3390/md18120634>
- Xiong, Z., Wang, R., Xia, T., Zhang, S., Ma, S., Guo, Z., 2023. Natural products and biological activity from Actinomycetes associated with marine algae. *Molecules* 28, 5138.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28135138>
- Xu, Y., He, H., Schulz, S., Liu, X., Fusetani, N., Xiong, H., Xiao, X., Qian, P.-Y., 2010. Potent antifouling compounds produced by marine Streptomyces. *Bioresour. Technol.* 101, 1331–1336. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.046>

- Xu, Y., Wang, L., Gong, Q., Zhu, G., Yuan, C., Zuo, M., Rao, Q., Zhu, W., Hao, X., 2018. Kojic acid derivatives and sesquiterpenes from the *Aspergillus flavus* GZWMJZ-288, A fungal endophyte of *Garcinia multiflora*. *Nat. Prod. Commun.* 13, 1934578X1801301102. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801301102>
- Yao, H., Sun, X., He, C., Maitra, P., Li, X.-C., Guo, L.-D., 2019. Phyllosphere epiphytic and endophytic fungal community and network structures differ in a tropical mangrove ecosystem. *Microbiome* 7, 57. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0671-0>
- Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.* 50, 75–104. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2003.06.001>
- Yeh, H.-H., Chiang, Y.-M., Entwistle, R., Ahuja, M., Lee, K.-H., Bruno, K.S., Wu, T.-K., Oakley, B.R., Wang, C.C.C., 2012. Molecular genetic analysis reveals that a nonribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) gene in *Aspergillus nidulans* is responsible for microperforanone biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 739–748. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4098-9>
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2014. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 42, D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Yin, Q., Liang, J., Zhang, W., Zhang, L., Hu, Z.-L., Zhang, Y., Xu, Y., 2019. Butenolide, a marine-derived broad-spectrum antibiofilm agent against both gram-positive and gram-negative pathogenic bacteria. *Mar. Biotechnol.* 21, 88–98. <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9861-1>
- Yu, X., Li, L., Sun, S., Chang, A., Dai, X., Li, H., Wang, Y., Zhu, H., 2021. A cyclic dipeptide from marine fungus *Penicillium chrysogenum* DXY-1 exhibits anti-quorum sensing activity. *ACS Omega* 6, 7693–7700. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00020>
- Zhang, F., Zhou, L., Kong, F., Ma, Q., Xie, Q., Li, J., Dai, H., Guo, L., Zhao, Y., 2020. Alertoxins with quorum sensing inhibitory activities from the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. KFD33. *Mar. Drugs* 18, 67. <https://doi.org/10.3390/md18010067>
- Zhang, H., Hua, Y., Chen, J., Li, X., Bai, X., Wang, H., 2018. Organism-derived phthalate derivatives as bioactive natural products. *J. Environ. Sci. Health Part C* 36, 125–144. <https://doi.org/10.1080/10590501.2018.1490512>
- Zhang, H.-B., Wang, L.-H., Zhang, L.-H., 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 4638–4643. <https://doi.org/10.1073/pnas.022056699>
- Zhang, H.-H., Yu, W.-Y., Li, L., Wu, F., Chen, Q., Yang, Y., Yu, C.-H., 2018. Protective effects of diketopiperazines from *Moslae Herba* against influenza A virus-induced pulmonary inflammation via inhibition of viral replication and platelets aggregation. *J. Ethnopharmacol.* 215, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.005>
- Zhang, M., Wang, M., Zhu, X., Yu, W., Gong, Q., 2018. Equisetin as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. Lett.* 40, 865–870. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2527-2>
- Zhao, J.-C., Wang, Y.-L., Zhang, T.-Y., Chen, Z.-J., Yang, T.-M., Wu, Y.-Y., Sun, C.-P., Ma, X.-C., Zhang, Y.-X., 2018. Indole diterpenoids from the endophytic fungus *Drechmeria* sp. as natural antimicrobial agents. *Phytochemistry* 148, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.01.010>

- Zheng, C.J., Sohn, M.-J., Lee, S., Kim, W.-G., 2013. Meleagrins, a new FabI inhibitor from *Penicillium chrysogenum* with at least one additional mode of action. PLoS ONE 8, e78922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078922>
- Zheng, H., Zhao, Y., Guo, L., 2022. A bioactive substance derived from brown seaweeds: phlorotannins. Mar. Drugs 20, 742. <https://doi.org/10.3390/md20120742>
- Zimmer, B.L., May, A.L., Bhedi, C.D., Dearth, S.P., Prevatte, C.W., Pratte, Z., Campagna, S.R., Richardson, L.L., 2014. Quorum sensing signal production and microbial interactions in a polymicrobial disease of corals and the coral surface mucopolysaccharide layer. PLoS ONE 9, e108541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108541>
- Zozaya-Valdes, E., Egan, S., Thomas, T., 2015. A comprehensive analysis of the microbial communities of healthy and diseased marine macroalgae and the detection of known and potential bacterial pathogens. Front. Microbiol. 6.
- Zuccaro, A., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Kohlmeyer, J., Draeger, S., Mitchell, J.I., 2008. Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. Appl. Environ. Microbiol. 74, 931–941. <https://doi.org/10.1128/AEM.01158-07>
- Zuccaro, A., Schulz, B., Mitchell, J.I., 2003. Molecular detection of ascomycetes associated with *Fucus serratus*. Mycol. Res. 107, 1451–1466. <https://doi.org/10.1017/s0953756203008657>
- Zuccaro, A., Summerbell, R.C., Gams, W., Schroers, H.-J., Mitchell, J.I., 2004. A new *Acremonium* species associated with *Fucus spp.*, and its affinity with a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade.



## Résumé en français

Les macroalgues brunes jouent un rôle crucial dans les écosystèmes marins et présentent un intérêt économique important. Ces dernières années, l'importance vitale du microbiote algal pour le développement et la survie des macroalgues a été mise en évidence. Pour autant, le rôle de ces microorganismes, ainsi que l'importance des interactions entre microorganismes au sein de l'holobionte algal restent peu explorés. Ce travail de thèse se focalise sur la macroalgue brune *Saccharina latissima*, une espèce majeure en Europe, dont la physiologie est fortement influencée par son microbiote, impactant sa morphogenèse, sa croissance et sa résistance aux pathogènes. Les travaux de cette thèse montrent que le microbiote de surface de *Saccharina latissima* abrite une grande diversité microbienne et qu'une communication chimique intense s'établit entre microorganismes. L'épimicrobiote de *Saccharina latissima* est constitué d'un core microbiote bactérien associé à un core métabolome. Cependant, des consortia bactériens ou fongiques variables d'un individu à l'autre modifient les métabolomes de surface, impliquant des composés d'interactions connus pour être émis chez les macroalgues en réponse à un stress biotique ou abiotique. Par ailleurs, une large collection de souches bactériennes et fongiques de l'épimicrobiote algal a été constituée, et les isolats ont montré d'importantes capacités de production de composés impliqués dans les mécanismes de communication intercellulaire (quorum sensing (QS)) ou inhibant la croissance de biofilms. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la recherche sur les interactions microbiennes dans les écosystèmes marins, en mettant en lumière des mécanismes putatifs de défense chez *Saccharina latissima*. De plus, l'identification de métabolites liés aux interactions microbiennes offre des opportunités dans le domaine des biotechnologies environnementales, notamment pour le développement d'antifoulings respectueux de l'environnement. Ce travail de thèse souligne également l'importance continue de l'exploration du microbiome des macroalgues pour mieux comprendre sa diversité et son rôle dans la santé des algues marines.

## Résumé en anglais

Brown macroalgae play a crucial role in marine ecosystems and provide a major economic interest. In recent years, the importance of the algal microbiota, essential to the development and survival of macroalgae, has been demonstrated. However, the role of these microorganisms associated with macroalgae, and the importance of interactions between microorganisms within the algal holobiont, remains largely unexplored. This thesis focuses on the model brown macroalga *Saccharina latissima*, a major species in Europe, whose physiology is strongly influenced by its microbiota, impacting its morphogenesis, growth, and resistance to pathogens. This thesis shows that the surface microbiota of *Saccharina latissima* is the seat of significant microbial diversity and established chemical communication between microorganisms. The epimicrobiota of *Saccharina latissima* is characterized by a core bacterial microbiota associated with a core metabolome. However, bacterial, or fungal consortia that vary from one individual to another, modify surface metabolomes. They also involve defense compounds known to be released by macroalgae in response to biotic or abiotic stress. In addition, a large collection of bacterial and fungal strains of epimicrobiota has been built up, and the isolates have shown significant capacity to produce compounds involved in the mechanisms of intercellular communication (quorum sensing (QS)) or inhibiting the growth of biofilms. These results open new perspectives for research into microbial interactions in marine ecosystems, by highlighting putative defense mechanisms in *Saccharina latissima*. In addition, the identification of metabolites linked to microbial interactions offers opportunities in the field of environmental biotechnologies, notably for the development of environmentally-friendly antifoulings. This thesis also highlights the continuing importance of exploring the macroalgal microbiome to better understand its diversity and its role in the fitness of marine algae.