

RAPPORT DE STAGE

Création et Utilisation d'Outils Biostatistique et Bio-informatique pour l'Analyse des Communautés Microbiennes Hydrocarbonoclastes Soumises à Différentes Conditions d'Oxygénation

Réalisé dans le pôle Chimie et Microbiologie de l'Environnement (CME) de l'Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM) sous tutelle de Mme. Cravo Laureau.

« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité du Laboratoire d'accueil »

Remerciements

Je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude envers le directeur de l'Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM), Jean-Marc Sotiropoulos, ainsi que ma responsable de stage, Cristiana Cravo Laureau. Leur encadrement, leur expertise et leur soutien tout au long de mon stage ont été inestimables. Je remercie également Robert Duran et François Rigal pour leur aide précieuse dans le domaine des statistiques et de la biologie analytique. Les travaux que j'ai réalisés lors de ce stage sont la suite d'une publication non finie, écrite par Cyril Noël et Fanny Terrisse et dont sans eux, rien de ceci aurait pu arriver. Je dois également remercier les membres de la communauté Curiosity d'Altearn, particulièrement Vincent Foriel et Théo Giraudet pour leur conseils. Je suis reconnaissant pour cette expérience inestimable et les leçons que j'ai apprises sous leur direction seront précieuses pour mon avenir. Merci infiniment pour cette opportunité exceptionnelle.

Table des matières

Remerciements	2
Introduction.....	1
1 - Matériel et Méthodes.....	2
2 - Résultats et Discussions	3
1. Organisation des communautés bactériennes en réponse aux conditions d'oxygénation	3
2. Organisation et dynamique des bactéries sulfato-réductrices en réponse aux oscillations d'oxygénation.....	5
Conclusion.....	8
Références bibliographiques.....	9
Annexes	12
Figures annexes	12
Code	14
Résumé	14

Introduction

Les percées dans les technologies de séquençage, telles que les méthodes de séquençage à haut débit, ont permis la collecte massive de données génomiques et métagénomiques (Hu et al., 2021), offrant ainsi de nouvelles opportunités de recherche. Cette quantité et cette complexité croissante des données générées nécessite des méthodes modernes pour leur traitement et leur analyse, d'où la nécessité de créer des outils alliant informatique, statistique et biologie. En utilisant cette approche, de nouvelles perspectives peuvent émerger dans la compréhension des phénomènes biologiques complexes. Dans le cas de mes travaux, ces outils seront adaptés à l'analyse des micro-organismes sulfato-réducteurs des communautés microbiennes benthiques hydrocarbonoclastes soumises à de conditions oscillantes d'oxygénation.

Les communautés microbiennes jouent un rôle crucial dans la détermination du devenir des hydrocarbures dans les environnements marins (Duran & Cravo-Laureau, 2016). Les bactéries sulfato-réductrices (BSR), importants acteurs dans les communautés microbiennes habitant les sédiments côtiers (Ana et al., 2000; Jiang et al., 2009), jouent un rôle central dans les cycles du soufre et du carbone (Jørgensen, 1977, 1982; Rabus et al., 2015), en particulier dans la dégradation anaérobie des hydrocarbures (Coates et al., 1997; Hayes & Lovley, 2002; Paissé et al., 2008; Stauffert et al., 2015)

Les sédiments marins côtiers sont soumis à des fluctuations fréquentes anoxiques/oxiques en raison de l'action mécanique (marées, vagues et courants) et biologique (bioturbation) influençant les structures des communautés microbiennes, en particulier en exerçant une pression importante sur la compétition pour les niches entre les BSR, les réducteurs de nitrates et les méthanogènes (Aller, 1994; Bertics & Ziebis, 2009; Boudreau & Marinelli, 1994; Brune et al., 2000; Cravo-Laureau & Duran, 2014; Duran et al., 2015; Kogure & Wada, 2005; Militon et al., 2015; Satoh et al., 2007). Nous émettons l'hypothèse que la modification des conditions d'oxygénation entraînera la réorganisation de la communauté microbienne, modifiant particulièrement la structure des BSR. L'analyse de ces modifications fournira de nouvelles perspectives sur la stratégie développée par les BSR en réponse à l'alternance des conditions anoxiques/oxiques. À cette fin, le comportement de trois communautés microbiennes dégradant les hydrocarbures a été comparé lorsqu'elles ont été soumises à des conditions d'oscillations anoxiques/oxiques dans des bioréacteurs. Le suivi des communautés bactériennes et BSR actives, par séquençage respectivement des transcrits des gènes de l'ARNr 16S et *dsrB*, a révélé la stratégie développée par les BSR pour s'adapter et survivre dans des conditions d'oscillations anoxiques/oxiques. Ces informations sont d'une importance capitale pour comprendre l'organisation des assemblages microbiens dans les sédiments marins côtiers soumis aux marées et pour leur gestion en vue de la mise en œuvre des stratégies de bioremédiation.

Le but de mon stage est donc de mettre en place des tests statistique et des représentations graphiques des données pour ensuite les interpréter. Ceci en utilisant Python comme langage de programmation (annexe code 1).

1 - Matériel et Méthodes

Les travaux présentés dans ce rapport sont basés sur de précédents travaux réalisés dans le cadre de deux thèses au sein du laboratoire IPREM (Noël, 2017; Terrisse, 2014). Lors de ces précédentes études, trois communautés microbiennes hydrocarbonoclastes différentes ont été obtenues en mésocosmes, par la mise en œuvre de différentes stratégies de remaniement du sédiment contaminé avec du pétrole : bioturbation avec ajout de polychètes, menant à l'obtention d'une communauté microbienne nommée communauté A ; hersage de la surface du sédiment, pour la communauté B ; et contrôle sans remaniement supplémentaire, correspondant à la communauté C. Celles-ci ont ensuite été incubées en bioréacteurs où elles ont été soumises, en triplicat, à trois conditions d'oxygénation différentes : anoxie permanente, oxie permanente et oscillations oxie/anoxie (figure 1).

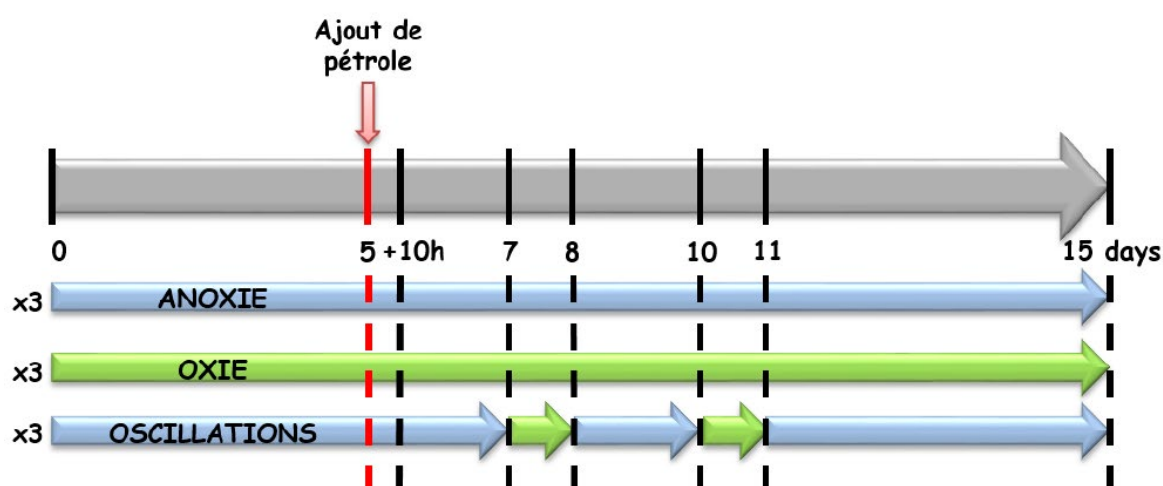


Figure 1 : Plan expérimental des incubations en bioréacteurs réalisées pour chaque communauté sous des conditions d'anoxie ou d'oxie permanentes ou en conditions oscillantes anoxie/oxie (Noël, 2017; Terrisse, 2014). La couleur bleue représente une phase anoxique et la couleur verte une phase oxique. La flèche oxique est totalement verte, la flèche anoxique, totalement bleue et la flèche oscillations est bleue avec la partie entre 7 et 8 jours verte ainsi que la partie entre 10 et 11 jours.

La table de variants de séquences d'amplicons (ASVs) utilisée lors du stage est basée sur le traitement des données brutes de pyroséquençage (Roche 454 FLX) des amplicons de la région variable V1-V3 du gène de l'ARNr 16S bactérien et des données de séquençage Illumina MiSeq des amplicons du gène *dsrB*. Le séquençage a été réalisé à partir des triplicatas des produits PCR l'ADNc (mélange de 3 échantillons d'extraits) provenant de chacun des 3 réplicas biologiques au début de l'expérience, cinq jours, cinq jours et dix heures, sept jours, huit jours, dix jours, onze jours et quinze jours après le début de l'expérience pour les communautés A, B et C. Les données brutes générées par le séquençage de ces prélèvements ont été traitées avec Qiime2 (Bolyen et al., 2019) dans le cadre du flux de travail *Standardized and Automated MetaBarcoding Analyses* (SAMBA, version v3.0.1). Les assignations taxonomiques des ASVs ont été effectuées dans SAMBA en utilisant la base de données SILVA (v138). La table est donc finalement constituée des temps de prélèvement, des échantillons, des communautés,

des conditions d'oxygénation, de leur taxonomie et de leur abondance relative (Noël, 2017; Terrisse, 2014).

La composition des différentes communautés microbiennes actives sous les différentes conditions d'incubation, constituée de données de séquençage d'ARNr 16S a été analysée en utilisant le Principal Coordinate Analysis (PCoA) avec la fonction `pcoa` du module `skbio.stats.ordination`. Pour toutes les ordinations PCoA, la mesure de distance de Bray-Curtis a été utilisée pour générer les matrices de dissimilarité et calculée grâce à la fonction `braycurtis` du module `scipy.spatial.distance` ([annexe code 2,3](#)).

Les co-occurrences par paire d'ASVs majeures (représentées par plus de 1 % du nombre total de séquences par échantillons) des trois communautés bactériennes sous des conditions d'oscillations anoxiques/oxiques ont été calculées ([annexe code 4](#)). Cette fonction classait les paires d'ASVs comme ayant des associations positives, négatives et aléatoires, en appliquant le modèle probabiliste de co-occurrence des espèces et avec une valeur seuil de 5% tel que décrit par Veech (2013).

La dynamique des BSR et des Bactéries Dénitrifiantes (BD) a été observée graphiquement, en observant les variations d'abondance relative des BSR et des BD en fonction du temps dans des conditions d'oscillation anoxique/oxique. La différence entre le groupe avant la première oxygénation et après la première oxygénation a été déterminée par un test de Student avec la fonction `ttest_ind` du module `scipy.stats`. Le rapport d'abondance BD/BSR tout au long de l'expérience dans des conditions d'oscillation anoxique/oxique, ainsi que dans des conditions permanentes anoxiques ou oxiques, a été représenté graphiquement. La progression de l'abondance relative des BD oxydant le soufre (BD-OS) et des BD hétérotrophes (BD-H), en corrélation avec le taux d'expression de BSR a été déterminée par le nombre de copies du rapport transcrit/gène *dsrB* divisé par le nombre de copies du rapport transcrit/gène de l'ARNr 16S. La représentation graphique des abondances relatives des ASV BD-OS et BD-H les plus abondantes (*Sulfurimonas* et *Marinobacter* respectivement) a été réalisée afin d'observer leur dynamique ([annexe code 5](#)).

Dans tous les graphiques, les périodes d'oxygénation sont indiquées par des zones grisées. Toutes les représentations graphiques ont été réalisées avec la fonction `pyplot` de `matplotlib`.

2 - Résultats et Discussions

1. Organisation des communautés bactériennes en réponse aux conditions d'oxygénation

Afin de mettre en évidence le rôle des conditions d'oxygénation dans l'organisation structurelle des trois communautés bactériennes hydrocarbonoclastes lorsque ces dernières sont incubées dans des bioréacteurs sous différents régimes d'oxygénation, différentes analyses statistiques ont été réalisées. Les analyses réalisées ont permis de distinguer trois groupes distincts (PermANOVA $p\text{-value} > 0.001$) correspondant aux trois communautés bactériennes initiales ([figure 2A](#)). En revanche, ces dernières se sont réorganisées en fonction des conditions d'oxygénation ([figure 2B](#)). L'analyse en positionnement multidimensionnel métrique aussi connu sous le nom d'Analyse en Coordonnées Principales (*Principal*

Coordinates Analysis, PCoA) à trois dimensions ([annexe 1.1](#)), basée sur les ASVs a révélé trois principaux clusters correspondant à chaque condition (anoxique permanente, oxique permanente et oscillations anoxique/oxique) indépendamment de l'origine de la communauté bactérienne ([figure 2B](#)). Cependant, seulement les échantillons sous conditions d'oscillations d'oxygénation, prélevés après la première oxygénation, forme ce troisième groupe ([annexe 1.2](#)). En effet, ne prenant en compte uniquement les échantillons après la première oxygénation pour le groupe soumis aux oscillations d'oxygénation, trois groupes bien distincts sont observés avec une p -value de PermANOVA > 0.001.

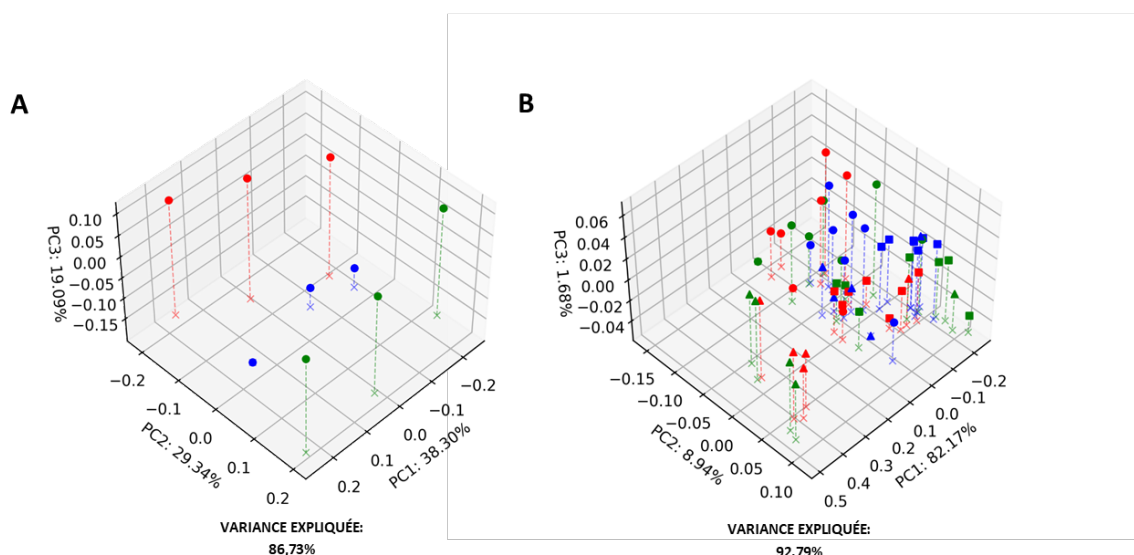


Figure 2 : Comparaison des structures des communautés bactériennes métaboliquement actives (A) pour les communautés microbiennes cinq jours après le début de l'incubation et (B) pendant les incubations en bioréacteur. La PCoA est basée sur les ASVs bactériens pour les communautés microbiennes A (rouge), B (bleu) et C (vert) et pendant les incubations en bioréacteur sous condition anoxique permanente (carrés), condition d'oscillation anoxique/oxique (triangles) et condition oxique permanente (cercles). Les analyses ont été réalisées en triplicata biologique.

Cette observation suggère que les oscillations anoxique/oxique sélectionnent des microorganismes polyvalents bien adaptés aux conditions fluctuantes, conduisant à des assemblages microbiens spécifiques. De plus, ces microorganismes sous conditions oscillantes d'oxygénation, présents dans les échantillons suivant la période oxique se subdivisent en 3 sous-groupes distincts (PermANOVA p -value > 0.004).

Récemment, il a été démontré que les capacités de dégradation des hydrocarbures étaient maintenues sous des oscillations anoxiques/oxiques par la succession des écotypes (sous-population qui s'adapte à une niche spécifique) affiliés aux genres *Alcanivorax* et *Cycloclasticus*, principales bactéries hydrocarbonoclastes aérobies dans les sédiments étudiés (Terrisse *et al.*, 2017). Parmi les bactéries les plus abondantes, les BSR représentaient entre 8 et 18 %, les bactéries dégradant les hydrocarbures, *Desulfosarcina* (Watanabe, M., Higashioka, Y., *et al.*, 2017) dominant la communauté de BSR. Par conséquent, il est probable que l'organisation de la communauté microbienne sulfato-réductrice et son maintien dans des conditions d'oscillations anoxiques/oxiques impliquent d'autres stratégies.

2. Organisation et dynamique des bactéries sulfato-réductrices en réponse aux oscillations d'oxygénation

L'analyse de co-occurrence, examinant les associations des principales ASVs sous les conditions d'oscillations anoxiques/oxiques en tenant compte des trois communautés (A, B et C), a révélé que 14.45% des associations analysées étaient non aléatoires. La co-occurrence des ASVs de BSR sont de 15 aléatoires pour 5 positives d'une part et d'autre part, la co-occurrence des ASVs de bactéries BD est entièrement aléatoire (figure 3). Il est intéressant de noter que l'analyse de co-occurrence a montré que les ASVs de BSR et les ASVs de BD s'excluaient mutuellement ou avait des interactions aléatoires excepté pour *Sulfurimonas* qui est un genre dénitrifiant et sulfo-oxydant. Tout ceci suggère une alternance de ces groupes bactériens selon les conditions redox.



Figure 3 : Matrice de co-occurrence des principaux ASVs (abondance relative > 1 %). L'analyse, basée sur le modèle probabiliste de co-occurrence des espèces décrit par Veech, inclut les séquences des trois communautés bactériennes (A, B et C) sous condition d'oscillation anoxique/oxique. Les associations non aléatoires sont montrées en couleur, les associations positives (co-occurrence) en rouge et les associations négatives (exclusion) en bleu. Les cercles colorés indiquent les capacités métaboliques des ASV.

Afin de déterminer si la compétition entre les groupes de BSR et de BD joue un rôle crucial dans l'organisation globale de la communauté microbienne, le suivi de l'abondance des principales ASVs des groupes bactériens BSR et BD sous condition d'oscillations anoxique/oxique a été réalisé (figure 4). Ceci a montré un changement important du ratio BD/BSR après la première période d'aération, caractérisée par une légère augmentation de l'abondance des BD tandis que l'abondance des BSR a diminué de manière drastique suivant la première oxygénation pour ensuite se stabiliser (test de Student $p\text{-value} > 0.0001$; Figure 4A). Dans ces conditions d'oscillations d'oxygénation, le ratio BD/BSR continue d'augmenter après la première période d'oxygénation, pendant la période anoxique (test de Student $p\text{-value} > 0.05$), suivi d'une diminution après la deuxième période d'oxygénation, avec de nouveau une augmentation pendant la dernière période anoxique (figure 4B). En revanche, le ratio BD/BSR sous conditions oxique permanente diminue progressivement au fil du temps alors que celui sous condition anoxique permanente reste faible tout le long de l'expérience (Figure 4B). Ces résultats permettent de suggérer que les bactéries dénitrifiantes seraient mieux adaptées à un milieu dont le régime d'oxygénation oscille entre oxie et anoxie.

De plus, les résultats obtenus suggèrent que les conditions d'oscillations ont eu un impact sur l'activité des microorganismes sulfato-réducteurs, comme l'indique la baisse drastique de l'expression des gènes *dsrB* (Figure 4C), ce qui est cohérent avec la diminution de l'abondance des BSR (Figure 4A). En conséquence, l'abondance relative des bactéries dénitrifiantes oxydant le soufre (BD-SO) diminue suivant la première oxygénation (test de Student $p\text{-value} > 0.05$) alors que l'abondance relative bactéries dénitrifiantes hétérotrophes (BD-H) augmente légèrement (test de Student $p\text{-value} > 0.1$; Figure 4C).

Il est intéressant de noter que l'ASV BD-SO le plus abondant, affilié au genre *Sulfurimonas*, dont la croissance est favorisée par le sulfure (Dutta et al., 2020), a diminué drastiquement après la première oxygénation, tandis que l'abondance relative des ASVs affiliés à *Marinobacter*, un genre décrit par la capacité de dégradation des alcanes (Duran, 2010), a augmenté, devenant l'ASV BD-H le plus abondant (Figure 4D). Bien que *Marinobacter* soit peu abondant (entre 0.12% et 1.32% selon les échantillons ; annexe 2.1), il peut jouer un rôle crucial dans la communauté microbienne grâce à sa capacité de dénitrification et de dégradation des alcanes. Étant donné que *Marinobacter* est capable de dégrader les alcanes qu'en conditions oxiques, il était surprenant d'observer que *Marinobacter* profitait de la période anoxique en adoptant une stratégie de croissance rapide (stratégie r) lorsque l'oxygène n'était plus disponible (Figure 4D).

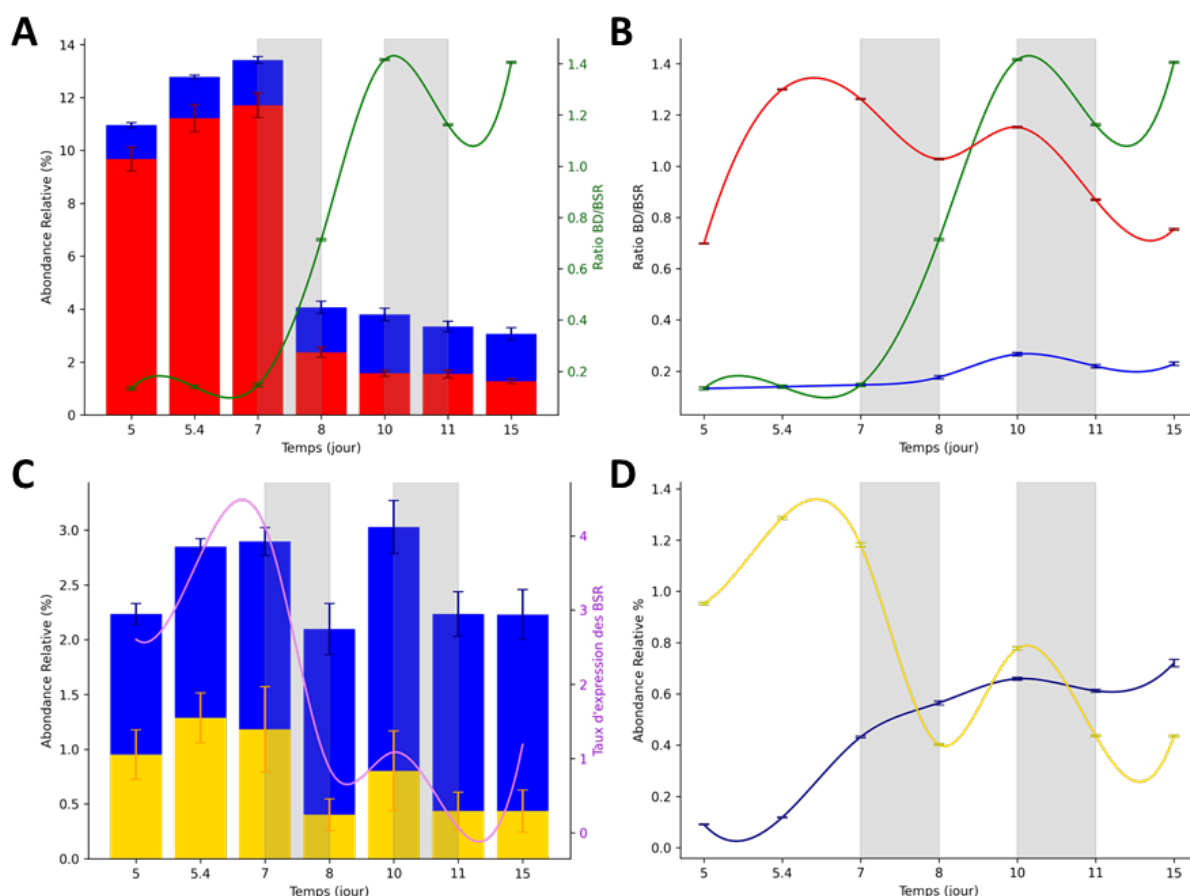


Figure 4 : Dynamique des bactéries sulfato-réductrices (BSR) et des bactéries dénitrifiantes (BD).

L'analyse a été réalisée avec les principaux ASV associés à chaque groupe bactérien. (A) Abondances relatives des BSR (rouge) et des BD (bleu) selon le temps sous condition d'oscillation anoxique/oxique. La courbe verte montre l'évolution du ratio d'abondance BD/BRS au cours de l'expérience. (B) Évolution du ratio d'abondance BD/BRS au cours de l'expérience sous condition d'oscillation anoxique/oxique (A/O, vert) et sous conditions anoxique (A, bleu) ou oxique (O, rouge) permanentes. (C) Évolution de l'abondance relative des BD oxydant le soufre (BD-SO, jaune) et des BD hétérotrophes (BD-H, bleu). Le taux d'expression des BSR (rose) correspond au nombre de copies du rapport transcrit/gène *dsrB* divisé par le nombre de copies du rapport transcrit/gène ARNr 16S. (D) Évolution des ASVs les plus abondants parmi les BD-SO (*Sulfurimonas*, jaune) et les BD-H (*Marinobacter*, bleu). Dans tous les graphiques, les zones ombrées indiquent les périodes d'oxygénation.

De plus, *Alcanivorax* et *Desulfosarcina* sont les deux principaux dégradateurs d'hydrocarbures dans cet écosystème (Terrisse et al., 2017). Il a déjà été précédemment démontré qu'*Alcanivorax* surpassait les bactéries dégradant les hydrocarbures (avec une abondance relative variant entre 18.25% et 64.26% en fonction de l'échantillon ; [annexe 2.2](#)) après la première période d'oxygénation sous condition d'oscillation anoxique/oxique (Terrisse et al., 2017), tandis que *Desulfosarcina* (avec une abondance relative de $7.77 \pm 1.99\%$ avant la première oxygénation) joue un rôle crucial dans la dégradation anaérobie des alcanes dans les écosystèmes marins (Kleindienst et al., 2014).

Il serait donc intéressant de mettre en relation les différents groupes bactériens et leur corrélation avec les composés hydrocarbonés pour comprendre l'organisation de la communauté microbienne benthique dégradant les hydrocarbures.

Conclusion

Les différents tests statiques et représentations développés ont permis de répondre à des questions scientifiques concernant les rôles des différentes conditions d'oxygénation sur les communautés microbiennes benthiques hydrocarbonoclastes. En effet, à l'aide des données d'abondance relative de bactéries benthiques il a été possible de démontrer qu'en fonction de l'origine des communautés (communautés A, B et C ; respectivement bioturbation, hersage, non perturbée), l'abondance des individus présents dans les différentes communautés microbiennes hydrocarbonoclastes est très différente et forme des groupes bien distincts. En revanche, ces communautés se réorganisent encore différemment suivant le régime d'oxygénation et ceci peu importe leur origine.

Continuant dans cette direction, différentes analyses ont permis de montrer que les BSR avaient tendance à co-occurrencer aléatoirement ou positivement entre elles, contrairement aux BD qui co-occurent de façon aléatoire. En revanche, cette analyse nous a permis de mettre en valeur la co-occurrence aléatoire ou négative entre les BSR et les BD, ce qui donne des premières pistes sur les interactions entre les différents groupes métaboliques.

Les analyses qui ont suivies ont permis de mettre en évidence le fait que les bactéries dénitrifiantes sont plus résistantes à des modifications de régime d'oxygénation. De plus suivant la première oxygénation, pour les bactéries soumises à un régime d'oscillations d'oxygénation, les BD hydrocarbonoclastes sont devenues majoritaires dans le groupe des BD, prenant ainsi une partie de la place que les BSR hydrocarbonoclastes ont laissés après s'être retrouvées beaucoup moins présentes. Donc ces groupes bactériens dénitrifiants permettent d'assurer une stabilité au sein des écosystèmes microbiens benthiques contaminés par le pétrole.

Il est encore difficile de pouvoir donner une conclusion générale sur le sujet car de nombreuses nouvelles questions se sont posées tout au long de cette étude. La suite logique des analyses à réaliser serait une étude de l'organisation du réseau microbien (Deng et al., 2012) ainsi que leur modularité (Meyer et al., 2020) pour lier l'organisation des modules avec les différents groupes métaboliques, les différents groupes initiaux définis par l'origine des communautés ainsi que par les différents régimes d'oxygénation. Se faisant ainsi, une conclusion générale sur la stabilité des écosystèmes microbiens hydrocarbonoclastes en fonction des conditions d'oxygénation et des conditions physico-chimiques (types d'hydrocarbures, remaniement sédimentaire), permettrait de mieux comprendre leur comportement dans des sédiments contaminés (Syakti et al., 2013) ainsi que de pouvoir prédire leur évolution et l'évolution des concentrations en hydrocarbures du milieu.

Références bibliographiques

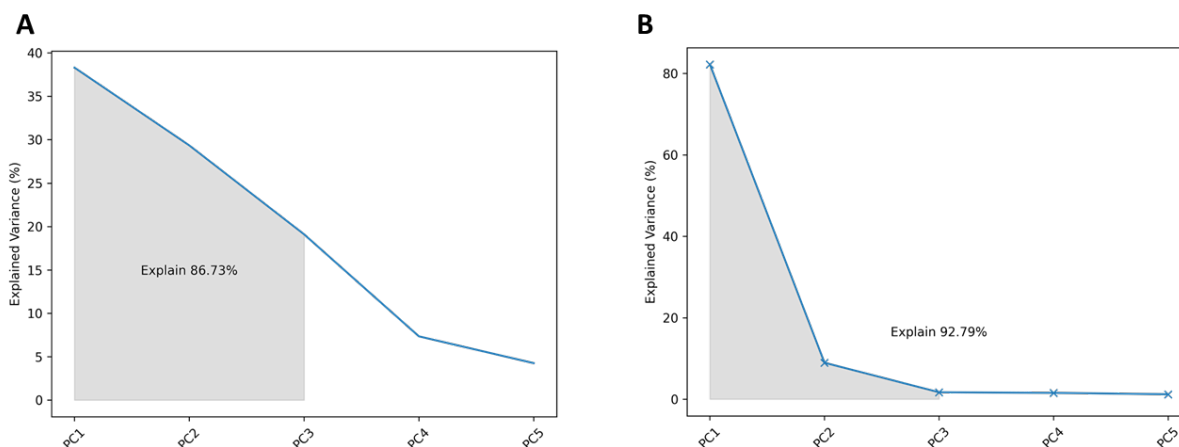
- Aller, R. C. (1994). Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chem Geol*, 114(3–4) : 331–345.
- Ana, C., Josefa, A., Susana, B., Andrew, D., A, H. R., & Francisco, R.-V. (2000). Prokaryotic Diversity in *Zostera noltii*-Colonized Marine Sediments. *Appl Environ Microb*, 66(4) : 1715–1719.
- Noël, C. (2017) Réseaux microbiens de dégradation des hydrocarbures aux interfaces oxe/anoxie des sédiments marins côtiers. Thèse de doctorat ès sciences, Université de Pau et Pays de l'Adour.
- Terrisse, F. (2014) Influence des oscillations anoxie/oxie sur des communautés microbiennes hydrocarbonoclastes de sédiments intertidaux. Thèse de doctorat ès sciences, Université de Pau et Pays de l'Adour.
- Bertics, V. J., & Ziebis, W. (2009). Biodiversity of benthic microbial communities in bioturbated coastal sediments is controlled by geochemical microniches. *ISME J*, 3(11) : 1269–1285
- Boudreau, B. P., & Marinelli, R. L. (1994). A modelling study of discontinuous biological irrigation. *J.MAR.RES.*, 52(5) : 947-968
- Brune, A., Frenzel, P., & Cypionka, H. (2000). Life at the oxic-anoxic interface: Microbial activities and adaptations. In *FEMS Microbiol Rev* 24(5) : 691-710
- Coates, J. D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., & Lovley, D. R. (1997). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl Environ Microb*, 63(9) : 3589-3593
- Cravo-Laureau, C., & Duran, R. (2014). Marine coastal sediments microbial hydrocarbon degradation processes: Contribution of experimental ecology in the omics'era. *Front Microbiol*. 5
- Deng, Y., Jiang, Y. H., Yang, Y., He, Z., Luo, F., & Zhou, J. (2012). Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinfo*, 13(113).
- Duran, R. (2010). *Marinobacter. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1725–1735
- Duran, R., Bonin, P., Jezequel, R., Dubosc, K., Gassie, C., Terrisse, F., Abella, J., Cagnon, C., Milton, C., Michotey, V., Gilbert, F., Cuny, P., & Cravo-Laureau, C. (2015). Effect of physical sediments reworking on hydrocarbon degradation and bacterial community structure in marine coastal sediments. *Environ Sci Pollut R*, 22(20) : 15248–15259.
- Duran, R., & Cravo-Laureau, C. (2016). Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. *FEMS Microbiol Rev*, 40(6), 814–830.
- Dutta, A., Smith, B., Goldman, T., Walker, L., Streets, M., Eden, B., Dirmeier, R., & Bowman, J. S. (2020). Understanding Microbial Community Dynamics in Up-Flow Bioreactors to Improve Mitigation Strategies for Oil Souring. *Front Microbiol*, 11(DEC).

- Hayes, L. A., & Lovley, D. R. (2002). Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments. *Microbial Eco*, 43(1) : 134–145.
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*, 82(11) : 801-811.
- Jiang, L., Zheng, Y., Peng, X., Zhou, H., Zhang, C., Xiao, X., & Wang, F. (2009). Vertical distribution and diversity of sulfate-reducing prokaryotes in the Pearl River estuarine sediments, Southern China. *FEMS Microbiol Rev*, 70(2) : 249–262.
- Jørgensen, B. B. (1977). The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnol Oceanogr*, 22(5) : 814-832.
- Jørgensen, B. B. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulphate reduction. *Nature*, 296(5858) : 643–645.
- Kleindienst, S., Herbst, F. A., Stagars, M., Von Netzer, F., Von Bergen, M., Seifert, J., Peplies, J., Amann, R., Musat, F., Lueders, T., & Knittel, K. (2014). Diverse sulfate-reducing bacteria of the Desulfosarcina/Desulfococcus clade are the key alkane degraders at marine seeps. *ISME J*, 8(10) : 2029–2044.
- Kogure, K., & Wada, M. (2005). Impacts of Macrobenthic Bioturbation in Marine Sediment on Bacterial Metabolic Activity. *Microbes Environ*, 20(4) : 191-199.
- Meyer, J. M., Leempoel, K., Losapio, G., & Hadly, E. A. (2020). Molecular Ecological Network Analyses: An Effective Conservation Tool for the Assessment of Biodiversity, Trophic Interactions, and Community Structure. *Front Eco Evo*, 8(NOV).
- Militon, C., Jézéquel, R., Gilbert, F., Corsellis, Y., Sylvi, L., Cravo-Laureau, C., Duran, R., & Cuny, P. (2015). Dynamics of bacterial assemblages and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-contaminated coastal marine sediments subjected to contrasted oxygen regimes. *Environ Sci Pollut R*, 22(20) : 15260-15272.
- Paissé, S., Coulon, F., Goñi-Urriza, M., Peperzak, L., McGenity, T. J., & Duran, R. (2008). Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiol Rev*, 66(2) : 295–305.
- Rabus, R., Venceslau, S. S., Wöhlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. D., & Pereira, I. A. C. (2015). A Post-Genomic View of the Ecophysiology, Catabolism and Biotechnological Relevance of Sulphate-Reducing Prokaryotes. In *Adv Microbiol Physiol*, 66 : 55-321.
- Satoh, H., Nakamura, Y., & Okabe, S. (2007). Influences of infaunal burrows on the community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments. *Appl Environ Microb*, 73(4).
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., & Duran, R. (2015). Dynamic of sulphate-reducing microorganisms in petroleum-contaminated marine sediments inhabited by the polychaete *Hediste diversicolor*. *Environ Sci Pollut R*, 22(20) : 15273–15284.
- Syakti, A. D., Yani, M., Hidayati, N. V., Siregar, A. S., Doumenq, P., & Made Sudiana, I. M. (2013). The bioremediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria isolated from a mangrove contaminated by petroleum hydrocarbons on the Cilacap coast, Indonesia. *Bioremediation Journal*, 17(1) : 11-20.

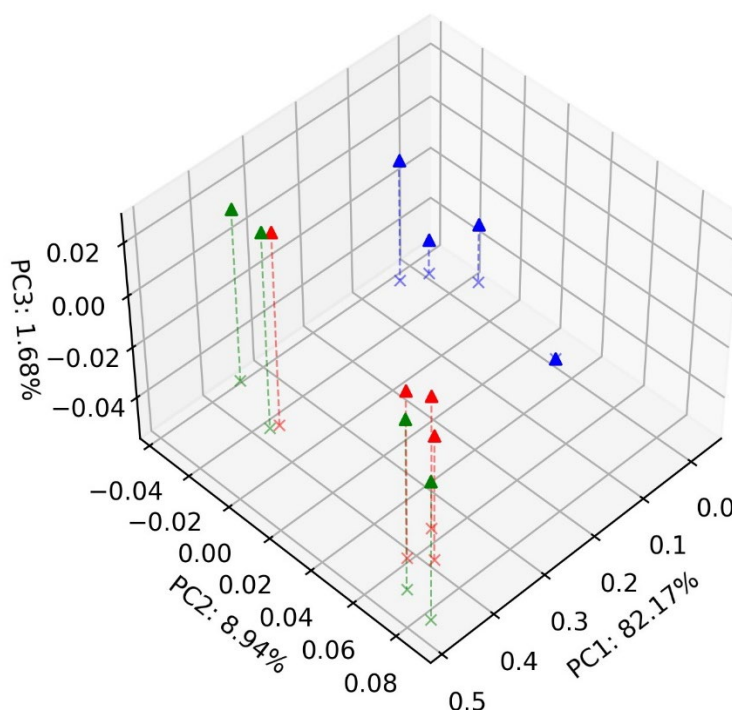
Terrisse, F., Cravo-Laureau, C., Noël, C., Cagnon, C., Dumbrell, A. J., McGenity, T. J., & Duran, R. (2017). Variation of oxygenation conditions on a hydrocarbonoclastic microbial community reveals *Alcanivorax* and *Cycloclasticus* ecotypes. *Front Microbiol*, 8(AUG).

Annexes

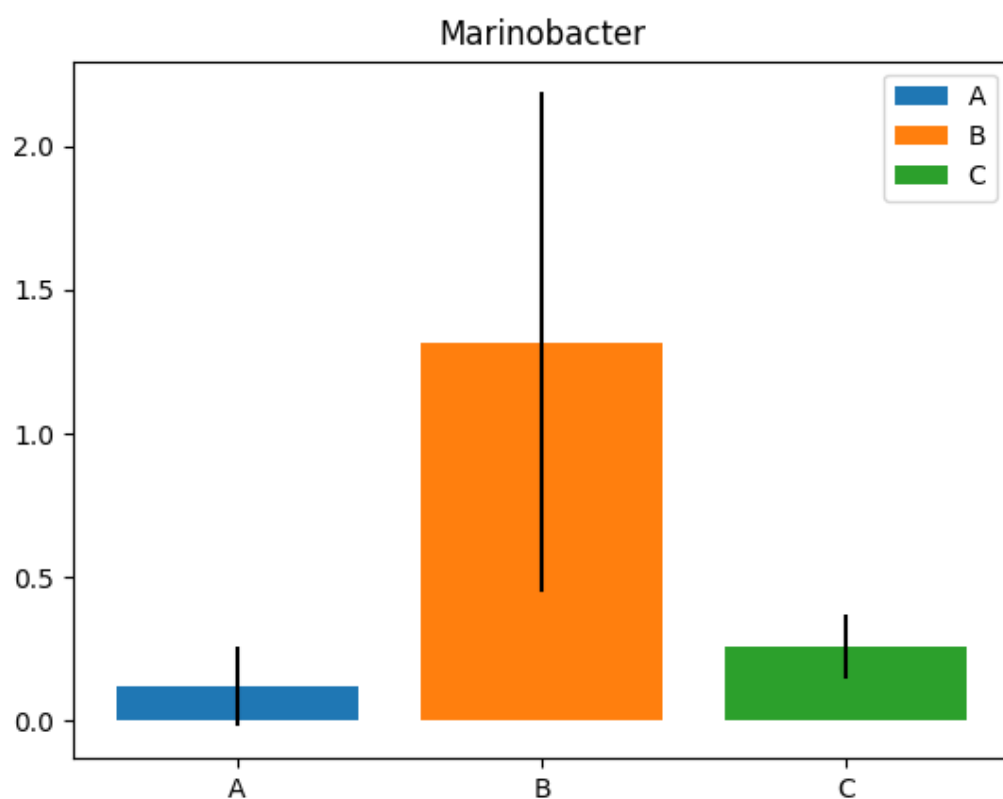
Figures annexes



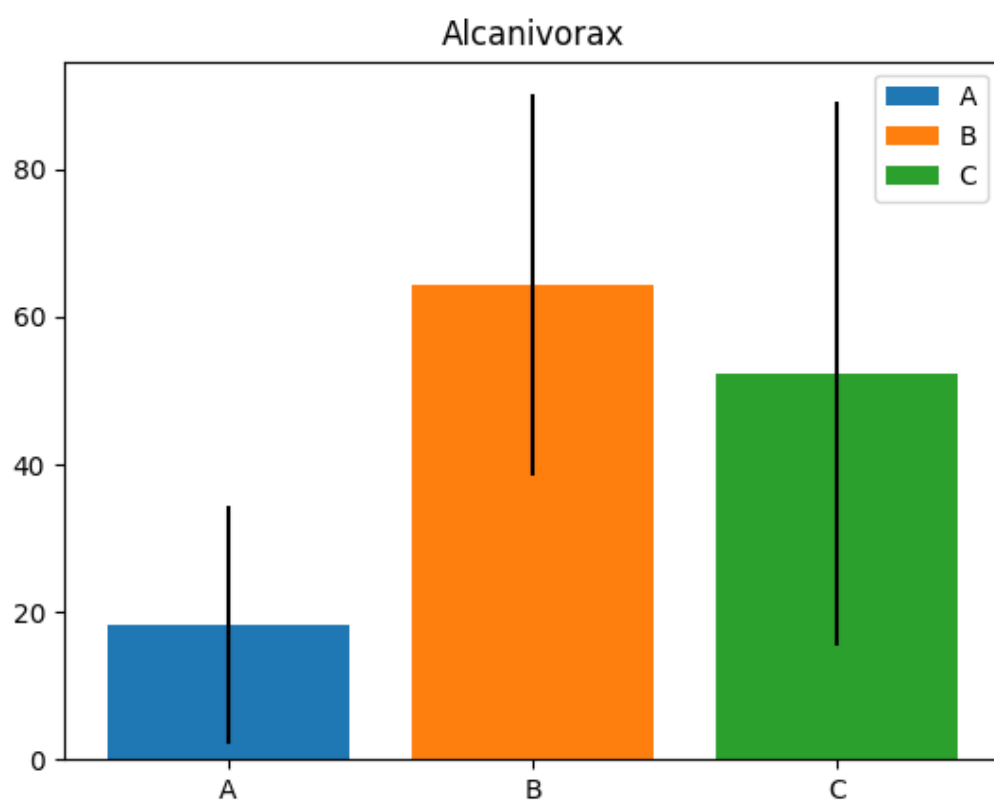
Annexe 1.1 : Évolution du pourcentage de variance expliqué par les trois axes de la figure 2.A (A) et 2.B (B).



Annexe 1.2 : Comparaison des structures des communautés bactériennes métaboliquement actives pendant les incubations en bioréacteur sous régime oscillant d'oxygénation après la première période d'oxygénation. L'Analyse de PCoA est basée sur les pyrotags des transcrits de gènes ARNr 16S bactériens pour les communautés microbiennes A (rouge), B (bleu) et C (vert). Les analyses ont été réalisées en triplicata biologique.



Annexe 2.1 : Répartition de l'abondance de *Marinobacter* en condition d'oxygénation oscillatoire selon les différentes communautés d'origine après la première oxygénation



Annexe 2.2 : Répartition de l'abondance d'*Alcanivorax* en condition d'oxygénation oscillatoire selon les différentes communautés d'origine après la première oxygénation

Code

1. Code complet : <https://github.com/RaphaelRibes/Analysis-of-Hydrocarbonoclastic-Microbial-Communities-Subjected-to-Different-Oxygenation-Conditions>
2. Ordination de la composition des différentes communautés microbiennes actives cinq jour et quatre heures après le début de l'expérience: https://github.com/RaphaelRibes/Analysis-of-Hydrocarbonoclastic-Microbial-Communities-Subjected-to-Different-Oxygenation-Conditions/blob/master/fig_2.a.py
3. Ordination de la composition des différentes communautés microbiennes actives sous les différentes conditions d'incubation : https://github.com/RaphaelRibes/Analysis-of-Hydrocarbonoclastic-Microbial-Communities-Subjected-to-Different-Oxygenation-Conditions/blob/master/fig_2b.py
4. Les co-occurrences par paire d'ASVs majeures des trois communautés bactériennes sous des conditions d'oscillations anoxiques/oxiques : https://github.com/RaphaelRibes/Analysis-of-Hydrocarbonoclastic-Microbial-Communities-Subjected-to-Different-Oxygenation-Conditions/blob/master/fig_3.py
5. Représentation graphique et analyses statistique amenant à la figure 4 : https://github.com/RaphaelRibes/Analysis-of-Hydrocarbonoclastic-Microbial-Communities-Subjected-to-Different-Oxygenation-Conditions/blob/master/fig_4.py

Résumé

Ce rapport de stage présente l'analyse des communautés microbiennes hydrocarbonoclastes soumises à diverses conditions d'oxygénation, dans le cadre de recherches menées à l'IPREM. L'objectif principal est de développer et d'appliquer des outils biostatistiques et bio-informatiques pour analyser et caractériser ces communautés microbiennes, en se concentrant sur les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et les bactéries dénitrifiantes (BD). Trois communautés microbiennes distinctes ont été incubées dans des bioréacteurs sous conditions d'anoxie permanente, d'oxie permanente et d'oscillations anoxiques/oxiques. Les données de séquençage, traitées avec Qiime2 et analysées statistiquement avec Python, montrent que les conditions d'oxygénation influencent significativement la structure des communautés. Les BD s'adaptent mieux aux conditions oscillantes, tandis que l'abondance des BSR diminue après l'oxygénation. L'expression des gènes *dsrB* et l'abondance relative des ASVs indiquent que certaines bactéries, telles que *Sulfurimonas* et *Marinobacter*, jouent des rôles cruciaux dans ces environnements. Ces résultats apportent des perspectives importantes pour comprendre la dynamique des communautés microbiennes et leur rôle dans la bioremédiation des sédiments marins contaminés.

Mots clés : Communautés microbiennes, biostatistique, bio-informatique, hydrocarbures