

THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

École doctorale des sciences exactes et de leurs applications

Présentée et soutenue le 5 novembre 2014

par **Johanne AUBÉ**

pour obtenir le grade de docteur

de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

Spécialité : Physiologie et biologie des organismes-populations-interactions

STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DE TAPIS MICROBIENS CONTAMINES PAR DES HYDROCARBURES

MEMBRES DU JURY

RAPPORTEURS

- Karine ALAIN
- Pierre PEYRET

Chercheur CNRS / Université de Bretagne Occidentale
Professeur / Université d'Auvergne

EXAMINATEURS

- Patricia BONIN
- Rémy GUYONEAUD

Directeur de recherche / Aix Marseille Université
Professeur / Université de Pau et des Pays de l'Adour

DIRECTEUR

- Maria-Soledad GOÑI-URRIZA

Maître de conférences / Université de Pau et des Pays de l'Adour



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'Equipe Environnement et Microbiologie de l'Institut des Sciences Analytiques et de Physico-chimie pour l'Environnement et les Matériaux. Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Robert Duran pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire depuis mon stage de deuxième année de Master.

Je tiens également à remercier les rapporteurs, Karine Alain, chercheur CNRS à l'Université de Bretagne Occidentale, et Pierre Peyret, Professeur à l'Université d'Auvergne, pour avoir accepté d'apporter leur jugement sur ce travail.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet FUNHYMAT, je tiens à remercier toutes les personnes du projet avec lesquelles j'ai pu travailler : Edurne Biritxinaga-Etchart et Noëlle Bru du LMAP, Brice Boussière du LCABIE de l'IPREM, Frédéric Escudié, Jérôme Mariette, Pavel Senin et Christophe Klopp de la plateforme de bioinformatique Génotoul de Toulouse, Céline Jeziorski, Sophie Valière et Olivier Bouchez de la plateforme GeT-PlaGe Génotoul de Toulouse et Olivier Pringault d'ECOSYM de la Faculté de Sciences de Bizerte. Je remercie également Patricia Bonin du MIO de l'Université d'Aix Marseille, partenaire du projet qui a également bien voulu faire partie de ce jury en qualité d'examineur.

Je remercie également Bruno Deflandre de l'Université de Bordeaux, Ronan Jézéquel du laboratoire du CEDRE et Frédéric Coulon de l'Université de Cranfield pour leurs participations dans les analyses chimiques.

Aussi mes profonds remerciements vont à ma directrice de thèse, Marisol Goñi, pour m'avoir soutenue et fait confiance pendant ces quatre ans. Ta gentillesse et ta disponibilité ont su rendre ma thèse beaucoup plus agréable.

Je remercie tous les membres du laboratoire et en particulier Rémy et Cristiana qui ont participé au projet et qui m'ont particulièrement aidée sur les BSR. Merci d'avoir été aussi disponible Rémy, même après tes cascades à vélo tu as su trouver du temps pour me conseiller. Merci également à Mag et Tony qui ont toujours été de bons conseils, de bonnes aides et de bonnes écoutes. Merci enfin à Julie Taupiac, ma stagiaire qui a contribué à une partie de ce travail.

Une pensée également pour les amis thésards présents et passés, en particulier ceux qui ont traversé ces trois années avec moi : Fabien, Fanny et Txa. Ça n'a pas toujours été

facile et votre présence a été d'un grand secours, le laboratoire risque d'être drôlement vide sans vous.

Parce qu'il est important de garder un bon équilibre de vie pendant la thèse je remercie toutes les personnes qui ont gravité autour de moi pendant ces trois ans et qui m'ont permis d'en voir le bout :

Merci aux amis grimpeurs qui m'ont permis de décompresser ; Jéjé, Julie et Sophie qui a également été compagne de thèse. Une pensée également aux amies de longtemps, Manue, Marion et Marie, qui malgré la distance continuaient d'être présentes.

Un grand merci à ma famille qui m'a soutenue et poussée dans mes moments de doute. Merci à mes parents, ma sœur et Claude qui m'ont permis d'arriver jusque-là et sur lesquels j'ai toujours pu compter. Merci également à mes grand parents et notamment à René mon grand-père de cœur, c'est un grand regret pour moi que tu n'aies pas pu voir cet aboutissement.

Enfin un immense merci à JB ; la fin de thèse aurait été bien différente si tu n'avais pas été là, ton soutien quotidien et ta patience ont été d'une grande aide.

Merci à tous.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES ET DES TABLES	13
INTRODUCTION GENERALE	21
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	27
1. LES TAPIS MICROBIENS PHOTOSYNTHETIQUES	27
1.1. Les groupes microbiens fonctionnels majeurs structurant les tapis microbiens	29
1.1.1. Les phototrophes oxygéniques	29
1.1.2. Les bactéries hétérotrophes aérobies	30
1.1.3. Les bactéries chimiolithotrophes sulfo-oxydantes.....	30
1.1.4. Les bactéries phototrophes anoxygéniques	32
1.1.5. Les bactéries sulfato-réductrices.....	34
1.1.6. Les méthanogènes.....	36
1.1.7. Les bactéries fermentaires	36
1.1.8. Les autres groupes fonctionnels.....	37
1.2. Structure verticale et cycles biogéochimiques des tapis microbiens.....	37
1.2.1. Les gradients physico-chimiques.....	37
1.2.2. Les cycles biogéochimiques	38
1.2.2.1. Le cycle du carbone	38
1.2.2.2. Le cycle du soufre	39
1.2.2.3. Le cycle de l'azote	40
2. ADAPTATIONS DES TAPIS MICROBIENS	41
2.1. Dynamique naturelle des tapis face aux stress environnementaux	41
2.2. Dynamique des tapis microbiens face au pétrole	42
2.2.1. Origine et composition des pétroles	42
2.2.2. Dégradations des hydrocarbures.....	44
2.2.2.1. Biodégradation aérobie des hydrocarbures	44
2.2.2.2. Biodégradation anaérobie des hydrocarbures	45
2.2.3. La réponse des tapis microbiens au pétrole	46
2.2.3.1. Adaptation au pétrole des communautés de la phase oxique.....	47
2.2.3.2. Adaptation au pétrole des communautés de la phase anoxique	48

2.3.	Dyanmique des tapis microbiens face aux métaux	49
2.3.1.	Origine et rôle des métaux	49
2.3.2.	Adaptation des tapis microbiens aux métaux	50
3.	L'ETUDE DES TAPIS MICROBIENS EN ECOLOGIE MICROBIENNE.....	51
3.1.	Les techniques utilisées en écologie microbienne	51
3.1.1.	Les techniques culturales	51
3.1.2.	Les techniques biogéochimiques et microscopiques.....	52
3.1.3.	Les techniques moléculaires.....	54
3.2.	L'étude des fonctions métaboliques.....	55
3.2.1.	Marqueurs impliqués dans le cycle du carbone	57
3.2.1.1.	Marqueurs ciblant la fixation du carbone	57
3.2.1.2.	Marqueurs ciblant la dégradation de la matière organique.....	58
3.2.2.	Marqueurs impliqués dans le cycle du soufre	60
3.2.2.1.	Marqueurs ciblant la réduction des composés soufrés	60
3.2.2.2.	Marqueurs ciblant l'oxydation des composés soufrés.....	62
3.2.3.	Marqueurs impliqués dans le cycle de l'azote	62
3.2.3.1.	Marqueurs ciblant la fixation du diazote	62
3.2.3.2.	Marqueurs ciblant la dénitrification	63
3.2.3.3.	Marqueurs ciblant la nitrification	65
4.	OBJECTIFS	65
CHAPITRE II : PROCEDURES EXPERIMENTALES.....		69
1.	MATERIEL D'ETUDE	69
1.1.	Sites de prélèvement et échantillonnage	69
1.1.1.	Description des sites de prélèvement	69
1.1.2.	Stratégies d'échantillonnage	71
2.	ISOLEMENT DE BSR.....	71
2.1.	Cultures en microplaques.....	72
2.1.1.	Préparation du milieu de culture pour l'isolement de sulfato-réducteurs sur microplaque.....	72
2.1.2.	Isolément des BSR	72
3.	TECHNIQUES DE DOSAGES CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES.....	73
3.1.	Dosage des sulfures.....	73
3.2.	Dosage des sulfates	74

3.3.	Mesure de l'activité sulfato-réductrice.....	74
4.	TECHNIQUES MOLECULAIRES	75
4.1.	Extractions d'acides nucléiques	75
4.1.1.	Coextraction des acides nucléiques	75
4.1.2.	Purification des ARNm.....	75
4.1.3.	Contrôle de la qualité et de la taille	76
4.1.3.1.	Contrôle des ADN.....	76
4.1.3.2.	Contrôle des ARN.....	76
4.1.4.	La rétrotranscription <i>in vitro</i> des ARNs	76
4.2.	Réaction de polymérisation en chaine et purification	77
4.2.1.	Polymérisation en chaine.....	77
4.2.2.	Purification des produits de PCR.....	77
4.3.	Quantification des gènes et transcrits par amplification en temps réel	80
4.3.1.	Principe de la quantification par PCR en temps réel	80
4.3.2.	Génération d'un standard externe.....	80
4.3.2.1.	Standard externe pour la quantification des ADN	80
4.3.2.2.	Standard externe pour la quantification des ADNc	81
4.3.3.	Amplification en temps réel	82
4.4.	Analyses moléculaire de la diversité.....	82
4.4.1.	Analyse de la diversité par séquençage de Sanger	82
4.4.2.	Analyse de la diversité par séquençage haut débit	82
4.4.2.1.	Principe du séquençage illumina	82
4.4.2.2.	Séquençage des amplicons.....	83
4.4.2.3.	Séquençage systématique du métagénome et du métatranscriptome.....	84
5.	ANALYSES INFORMATIQUES	84
5.1.	Traitement des séquences de l'ARNr 16S obtenues par séquençage Sanger.....	84
5.2.	Traitement des séquences de l'ARNr 16S obtenues par séquençage haut débit.....	85
5.3.	Traitement des séquences des gènes fonctionnels obtenues par séquençage haut débit	86
5.4.	Traitement des séquences issues du séquençage systématique du métagénome et du métatranscriptome.	88
6.	ANALYSES STATISTIQUES	90
6.1.	Analyse de la diversité alpha.....	90
6.2.	Analyse de la diversité beta.....	91

6.3. Tests statistiques	91
CHAPITRE III : DIVERSITE, ACTIVITE ET FONCTIONNEMENT DE DEUX TAPIS MICROBIENS PRESENTANT DES CONTAMINATIONS EN HYDROCARBURES CONTRASTEES	95
1. INTRODUCTION	95
2. DIVERSITE, ACTIVITE ET FONCTIONNEMENT DE DEUX TAPIS MICROBIENS AYANT DES CONTAMINATIONS EN HYDROCARBURES CONTRASTEES.....	96
2.1. Introduction.....	96
2.2. Material and methods.....	97
2.2.1. Sampling sites and procedure.....	97
2.2.2. Physical and chemical analyses.....	97
2.2.3. DNA/RNA extraction and cDNA synthesis.....	98
2.2.4. Quantification of genes and transcripts	98
2.2.5. Gene and transcripts sequencing	99
2.2.6. Whole metagenome and metatranscriptome sequencing and bioinformatics procedures	99
2.2.7. Statistical analysis	99
2.3. Results.....	100
2.3.1. Site descriptions	100
2.3.2. Diversity of bacterial communities	103
2.3.3. Diversity of archaeal communities.....	108
2.3.4. Bacterial and Archaeal communities are affected by the environmental parameters	109
2.3.5. Metabolism of the microbial mat communities.....	110
2.4. Discussion.....	113
2.5. References.....	116
3. CONCLUSION DU CHAPITRE	119
CHAPITRE IV : STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DES MICROORGANISMES IMPLIQUES DANS LE CYCLE DU SOUFRE AU SEIN DES TAPIS MICROBIENS	123
1. INTRODUCTION	123
2. VARIATIONS SAISONNIERES DES POPULATIONS MICROBIENNES DU CYCLE DU SOUFRE AU SEIN DES TAPIS MICROBIENS LOCALISÉS SUR DEUX STATIONS DE L'ETANG DE BERRE.....	124
2.1. Introduction.....	124

2.2.	Materials and methods	125
2.2.1.	Site description and sampling location	125
2.2.2.	Physical and chemical analyses	126
2.2.3.	DNA/RNA extraction and cDNA synthesis	126
2.2.4.	Quantification of genes and transcripts	126
2.2.5.	Genes and transcripts sequencing	127
2.2.6.	Bioinformatics analyses	127
2.2.7.	Whole meta-genome and meta-transcriptome systematic sequencing and bioinformatics procedures	128
2.2.8.	Statistical analysis.....	128
2.3.	Results	129
2.3.1.	Quantification of functional genes.....	129
2.3.2.	Diversity of sulfur cycle microorganisms through PCR based methods.....	129
2.3.3.	Genes, expression and taxonomic description through systematic sequencing ..	134
2.4.	Discussion	137
2.5.	References	140
3.	ETUDE PAR DES APPROCHES POLYPHASIQUES DE LA STRUCTURE ET DU FONCTIONNEMENT DES COMMUNAUTES DE SULFATO-REDUCTEURS DE DEUX TAPIS MICROBIENS AUX CONTAMINATIONS EN HYDROCARBURES CONTRASTEES	145
3.1.	Introduction	146
3.2.	Materials and methods	147
3.2.1.	Site description, sample collection and Physical and chemical analyses	147
3.2.2.	Culture-based approach: Isolation and identification of SRB	148
3.2.3.	Molecular procedures	148
3.2.4.	16SrRNA and dsrB gene and cDNA amplification, sequencing and bioinformatics analyses	148
3.2.5.	Whole meta-genome and meta-transcriptome sequencing and bioinformatics procedures	149
3.2.6.	Statistical analysis.....	150
3.2.7.	Sequence data	150
3.3.	Results	151
3.3.1.	Physical and chemical characteristics of the sites	151
3.3.2.	Abundance, diversity and activity of SRP communities: PCR based analyses ...	152

3.3.3.	Abundance, diversity and activity of SRP communities: culture-based approach	155
3.3.4.	Abundance, diversity and activity of SRP communities: systematic sequencing	156
3.3.5.	Functional data analysis: Structure and activity of the SRB communities	156
3.3.6.	BSR isolates among metagenomic and metatranscriptomic data.....	160
3.3.7.	Discussion	161
3.4.	References.....	163
4.	CONCLUSION DU CHAPITRE	169
CHAPITRE V : DIVERSITE ET STRUCTURE DES MICROORGANISMES		
FIXATEURS DE CARBONE AU SEIN DU TAPIS MICROBIEN.....		
1.	INTRODUCTION	173
2.	RESULTATS	174
2.1.	Abondance des marqueurs fonctionnels impliqués dans le cycle de l’azote et du carbone.....	174
2.2.	Diversité des gènes de la RuBisCO	175
2.3.	Affiliation phylogénétique de la forme I « green-like » de la RuBisCO	176
2.4.	Affiliation phylogénétique de la forme II de la RuBisCO.....	179
3.	DISCUSSION	181
CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		
ANNEXES		
	Annexe 1.....	194
	Annexe 2.....	196
	Annexe 3.....	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		
		213

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- AOA:** Ammonia-oxidizing archaea
- AOB:** Ammonia-oxidizing bacteria
- ARN:** Acide ribonucléique
- BCSO:** Bactéries chimolithotrophes sulfo-oxydantes
- BHA:** Bactéries hétérotrophes aérobies
- BPA:** Bactéries phototrophes anoxygéniques
- BSR:** Bactéries sulfato-réductrices
- CCA:** Canonical Correspondance Analysis (Analyse Canonique des Correspondances)
- DMPD:** diméthyl-p-phénylènediamine
- dNTP :** Désoxyribonucléotides triphosphates
- EDTA :** Ethylène diamine tétraacéate
- EMBL:** European Molecular Biology Laboratory
- EPS:** Extracellular polymeric substances
- HAP:** hydrocarbures aromatiques polycycliques ou polyaromatiques
- KEGG:** The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- KO :** Kegg Orthology
- MOInt :** Matière organique intermédiaire
- NGS :** Next-Generation Sequencing (Séquençage de nouvelle génération)
- ND :** non déterminé
- OTU:** Operational taxonomic unit
- Pb/bp :** Paire de bases/base pair
- PCA :** Principal component analysis (Analyse en composantes principales)
- PCR:** Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
- qPCR :** quantitative Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne quantitative)
- RIN :** RNA Integrity Number
- RT:** Reverse-transcription
- RDNA:** Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium
- ZNIEFF :** Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique Faunistique et Floristique

LISTE DES FIGURES ET DES TABLES

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

- Figure I-1:** Photographies de tapis microbiens colonisant différents environnements : section transversale d'un stromatolithe recouvert par un tapis microbiens actif (a) ; carotte de glace (1,5 m de haut) issue du lac de Bonney en Antarctique contenant un tapis microbien (b) ; tapis microbiens dans une source chaude du parc national du Yellowstone (c), au niveau de sources hydrothermales profondes (d) et dans les marais salants de Camargue (e). Les photos (a) et (b) sont tirées d'une publication de Paerl *et al.*, (2000). La photo (e) a été prise par les membres de l'équipe environnement et microbiologie de l'IPREM (Pau, France). Les photos (c) et (d) sont issues des sites internet : (c), <http://www.astrobio.net/pressrelease/3500/triangulating-photosynthesis> et (d), <http://www.soest.hawaii.edu/expeditions/mariana/dailyupdates-40.htm>. ..28
- Figure I-2:** Schéma simplifié d'un tapis microbien photosynthétique et des relation entre bactéries, associées aux gradients de lumière, d'O₂, de pH et d'H₂S en journée (modifié d'après Bordenave (2007)).....29
- Figure I-3** Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ARNr 16S des espèces de sulfato-réducteur décrites d'après Muyzer & Stams (2008).35
- Figure I-4:** Représentation schématique de l'organisation des principales communautés bactériennes au sein d'un tapis microbien, en fonction des gradients physico-chimiques d'oxygène, de sulfure et de lumière modifié d'après van Gemerden (1993) et Paisse (2009).38
- Figure I-5:** Cycle simplifié du carbone dans un tapis microbien, les processus de fixation du carbone sont indiqués en flèches pointillées et ceux des dégradations en flèches pleines. MOInt : Matière organique intermédiaire.39
- Figure I-6 :** Cycle du soufre simplifié au sein des tapis microbiens. Les réactions de réduction sont indiquées en flèches pleines et celles d'oxydations en flèches pointillées.40
- Figure I-7:** Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules (Syakti, 2004).44
- Figure I-8:** Réaction initiale de dégradation anaérobie des hydrocarbures saturés et aromatiques. D'après Widdel & Rabus, (2001). Addition de fumarate (a,b,c,d), déshydrogénation (e) et carboxylation (f).46
- Figure I-9 :** Rôle hypothétique de différents groupes fonctionnels colonisant les tapis microbiens dans la dégradation du pétrole (Duran & Goñi-Urriza, 2010).48
- Figure I-10:** Arbre phylogénétique basé sur les acides aminés de la RuBisCO (forme I à III) et de la RuBisCO-like (forme IV) provenant d'organismes procaryotes et eucaryotes d'après Hanson & Tabita, (2001).....58
- Figure I-11 :** Arbres phylogénétiques montrant les relations entre les séquences de l'ARNr 16S (A) et du gène *mcrA* (B) des méthanogènes d'après Luton *et al.*, (2002).....59
- Figure I-12:** Schéma simplifié de la voie dissimilatrice de la sulfato-réduction modifiée d'après Bertrand *et al.*, (2011).....60
- Figure I-13:** Comparaison entre l'arbre phylogénétique de l'ARNr 16S et de DrsAB des procaryotes sulfato-réducteurs d'après Klein *et al.*, (2001).....61
- Figure I-14:** Comparaison entre l'arbre phylogénétique de l'ARNr 16S et du gène *nifH* issu de souche cultivés d'après Zehr *et al.*, (2003).....63
- Figure I-15:** Voie métabolique de la dénitrification. Les enzymes nitrate réductase (Nar), nitrite réductase (Nir), oxide nitrique réductase (Nor) et oxyde nitreux réductase (Nos) sont codées respectivement par les gènes *nar*, *nir*, *nor* et *nos* (Kirchman, 2012).....64
- Figure I-16 :** Schéma simplifié de la nitrification d'après Bertrand *et al.*, (2011).....65

Table I-1: Les différents groupes de bactéries phototrophes anoxygéniques et leurs caractéristiques principales, modifié d'après Bertrand <i>et al.</i> (2011). (a) Les donneurs d'électrons accessoires sont cités entre parenthèses.....	33
---	----

CHAPITRE II : Procédures expérimentales

Figure II-1: Situation géographique de l'étang de Berre et des sites de prélèvement. Carte modifiée d'après Rigaud <i>et al.</i> , (2012).....	70
Figure II-2: Schéma synthétique de la procédure utilisée pour l'isolement de BSR en microplaques.	73
Figure II-3 : Principales étapes de séquençage par la technologie illumina (modifié d'après (Mardis, 2008)	83
Figure II-4 : Description des étapes utilisées pour le traitement des séquences de l'ARNr16S bactérien et archéen	86
Figure II-5: Description des étapes du pipeline utilisé pour le traitement des séquences des gènes fonctionnels.....	88
Figure II-6 : Comparaison des logiciels d'alignement Blast, Last et Pauda sur un échantillon aléatoire de 100000 séquences (P. Senin non publié).....	90
Table II-1 : Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés lors des PCRs. NGS ; Next-Generation Sequencing (séquençage de nouvelle génération).....	78
Table II-2 : Données obtenues au travers du pipeline utilisé pour traiter les séquences de l'ARNr 16S des bactéries et archées	86
Table II-3: Paramètres utilisés pour traiter les gènes fonctionnels avec le pipeline genefunc et données obtenues	88
Table II-4 : Temps de calcul des aligneurs sur la base de données KEGG à partir d'un échantillon de 100 000 séquences tirées aléatoirement ou avec un réplicata de l'échantillon d'ARNm de SL de la campagne C2.....	89

CHAPITRE III : Diversité, activité et fonctionnement de deux tapis microbiens présentant des contaminations en hydrocarbures contrastées

Figure III-1: Principal component analysis of parameters describing EDB1 and SL sites based on physicochemical parameters (a), metal contents (b) and hydrocarbon contents for EDB1 site (c). Replicates were given in black and averages of replicates in pink boxes. Abbreviations are: AGP, Areal rates of gross photosynthesis; BT1-BT4, C1 to C4-benzo(b)thiophenes; C1-C3, C1 to C3-chrysenes; C/N, carbon/nitrogen; Deni Tot, denitrification total; N Fix, nitrogen fixation; D1-D4, C1 to C4-dibenzothiophenes; FL1-FL3, C1 to C3-fluoranthenes/pyrenes; N1-N4, C1 to C4-Naphtalenes; NP, net photosynthesis; OC, organic carbon; P1-P4, C1 to C4-phenanthrenes/anthracenes; P/W, Pore Water; R respiration; Sed, sediment; TC, total carbon; TN, total nitrogen, TS, total sulfur.	101
Figure III-2: Abundance of 16S rRNA genes (a) and transcripts (b) across the two sites on the four campaigns. Abundance is given in number of copies per g of dry sediments. Error bars represent the standard deviation.	102
Figure III-3: Clustering of <i>Bacteria</i> (a) and <i>Achaea</i> (b) communities presents (DNA) and actives (cDNA).	104
Figure III-4 : Taxonomic affiliation of the 16SrRNA gene and transcripts of <i>Bacteria</i> (a) and <i>Archaea</i> (b) at the class level.....	105

Figure III-5: Heatmap representation of the relative abundance of the 100 most abundant OTU among bacteria 16S rRNA genes and transcripts. A white background indicates no hits for the OTU. A neighbour joining phylogenetic tree of nucleic similarity clustered representative sequences of OTUs.....	106
Figure III-6 : CCA between the 16SrRNA gene of the bacterial (a) and archaeal (b) communities and the transcripts (bacteria (c) archaea (d)) of each sampling and the biogeochemical parameters. 109	109
Figure III-7 : KEGG metabolic analysis of the metagenome and metatranscriptome of both microbial mats. Data represent the mean of replicates.....	110
Figure III-8 : PCA of the metagenomes annotated with the KEGG metabolic categories. Each full dot represents a replicate.....	111
Figure III-9 : Number of genes significantly more expressed in the mats, grouped according to the kegg pathways ($p_{adj} < 0,1$).....	112
Figure III-10: Expression level of genes involved in hydrocarbon degradation (aromatics and alkanes) in EDB1 sites. The figure presents exclusively the genes showing significantly higher activities in contaminated site compared to the pristine site	112
Figure III-11 : Gene significantly more expressed ($p_{adj} < 0,1$) among spring and autumn seasons through the energy metabolism pathway.	113
Table III-1 : Observed prokaryotic richness and diversity estimates based on 97% OTU clusters....	103

CHAPITRE IV : Structure et fonctionnement des microorganismes impliqués dans le cycle du soufre au sein des tapis microbiens

Figure IV-1 : Abundance of functional gene markers for sulfur cycle across four campaigns through PCR based methods. Identical letters above the bars indicate that the abundance or the expression were not significantly different according to a TukeyHSD test ($P < 0.05$) among each gene.	129
Figure IV-2 : Comparison of bacterial diversity among functional genes between the different sampling points through PCR based methods. (a) Cluster analysis of bacterial diversity using the Bray–Curtis dissimilarity. (b) Bar chart representing the relative abundance of the dominant families in the different stations. C0 and C2 were spring sampling whereas C1 and C3 were fall sampling.....	131
Figure IV-3: CCA realized on campaign C1, C2 and C3 between the bacterial communities of each station and the significant environmental parameters. The bacterial community structure is represented using OTU tables of the genes <i>dsrB</i> (a), <i>aprA</i> (b), <i>soxB</i> (c), and <i>pufM</i> (d). Abbreviations are: TS, Total Sulfur; OC, Organic Carbon; H ₂ S OW, Sulfide Overlaying Water.....	132
Figure IV-4: Relative abundance of the genes <i>aprA</i> , <i>dsrB</i> , <i>soxB</i> and <i>pufM</i> through systematic sequencing of the metagenome (a) and expression of the gene (b). Analyses were realized on campaign C1 and C3 (fall sampling) and C2 (spring sampling).....	134
Figure IV-5: Taxonomic affiliation of the <i>dsrB</i> (a), <i>aprA</i> (b), <i>soxB</i> (c) and <i>pufM</i> (d) genes and transcripts at the family level through systematic sequencing. Analyses were realized on campaign C1 and C3 (fall sampling) and C2 (spring sampling).....	136
Figure IV-6 : (a) Abundance of 16S rRNA genes and <i>dsrB</i> (used as a marker for sulfate reducing prokaryotes) (b) Expression of <i>dsrB</i> gene at the day and night. Identical letters above the bars indicate that the abundances or the gene expression were not significantly different according to a Tukey HSD test ($P < 0.05$).....	152
Figure IV-7: Sulfate-reducing bacteria community composition at both studied sites obtained through multiples approaches: genes and transcripts (cDNA) of the <i>dsrB</i> and the 16SrRNA (both PCR	

based techniques), 16S rDNA and 16S rRNA sequences obtained through the metagenomic and metatranscriptomic systematic sequencing and the culture-based approach.153

Figure IV-8 : Venn diagram representing (a), the OTU richness (based on *dsrB* genes and transcripts) shared between sites and (b), the OTU richness shared between transcripts found in both sites during day or night conditions. Percentages in bold characters are the relative abundance of reads for the considered samples or conditions154

Figure IV-9 : Heatmap representation of the relative abundance of the 50 most abundant OTU among *dsrB* genes and transcripts. A white background indicates no hits for the OTU. A neighbour joining phylogenetic tree of amino acids similarity clustered representative sequences of *dsrB* OTUs. The 50 most abundant OTU represented more than 70% of the *dsrB* sequences for all the samples.....155

Figure IV-10: Relative abundance of the 20 most abundant SR transcripts (obtained from the metatranscriptomic dataset) and their related ortholog group number from KEGG. Sulfate reduction related transcripts are enclosed in the orange box, stress response gene in the red box, Wood-Ljungdahl pathway in the green box, ATP production in the purple box, membrane transport in the brown box, nitrogen fixation in the blue box and translation related genes in the yellow box. Abbreviations are: *acs/CODH*, acetyl-CoA synthase/CO dehydrogenase; *aprAB*, adenylylsulfate reductase; *atpAD*, F-type H⁺-transporting ATPase subunit alpha and beta; *cdhC*, CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase complex; *cspA*, cold shock protein (beta-ribbon, CspA family); *dsrABC*, dissimilatory sulfite reductase complex; *fhs*, formate-tetrahydrofolate ligase; *fusA*, elongation factor G; *groEL*, chaperonin GroEL; *hppA*, K(+)-stimulated pyrophosphate-energized sodium pump; *livK*, branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein; *nifDK*, nitrogenase; *sat*, sulfate adenylyl transferase; *tuf*, elongation factor Tu.157

Figure IV-11: Metabolic reconstruction of the main metabolic routes detected in the SRP communities. The cytoplasmic membrane is shown in grey. Arrows indicate central metabolic pathways of the community and dashed lines indicate putative electron flows. Sulfate reduction pathway is shown in the green box, nitrogen fixation and assimilation in the blue box, wood-ljungdahl pathway in the red box and hydrocarbon pathway mainly link to EDB1 sampling site in the orange box. Abbreviations are: *Acs/CODH*, acetyl-CoA synthase/CO dehydrogenase; *Amt*, ammonium transporter; *AprAB*, adenylylsulfate reductase; *Bbs*, enzymes for the modified β -oxidation to benzoyl-CoA; *BssABC*, benzylsuccinate synthase; *Cdh*, CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase complex; *DctPQM*, TRAP-type C4-dicarboxylate transporteur; *DsrABC*, dissimilatory sulfite reductase complex; *DsrOP*, transmembrane dissimilatory sulfite reductase complexe; *FdhABC*, formate dehydrogenase; *Fhs*, formate-tetrahydrofolate ligase; *Fold*, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase; *GdhA*, glutamate dehydrogenase; *GlnA*, glutamine synthetase; *HrdABC*, heterodisulfite reductase; *HynAB*, periplasmique [Ni/Fe] hydrogenase; *MetF-ABC*, methylenetetrahydrofolate reductase; *MvhADG* methyl viologen-reducing hydrogenase; *NifDKH*, nitrogenase; *PflD*, putative alkylsuccinate synthase; *PorA/NifJ* pyruvate:ferredoxin oxidoreductase; *QmoABC*, quinone-interacting membrane-bound oxidoreductase complex; *Sat*, sulfate adenylyl transferase; *SdhABBC*, succinate dehydrogenase/fumarate reductase; *SulP*, sulfate permease; *Tst*, thiosulfate sulphur transferase.158

Table IV-1 : Observed prokaryotic diversity among sites through PCR based method. Sobs are the number of observed OTU for an OTU definition130

Table IV-2 : Main physical and chemical characteristics for both studied sites. Dark grey color highlights a higher than Upper Chemical Exceedance Level (UCEL) metal concentration,

whereas light grey color highlights a higher than Lower Chemical Exceedance Level (LCEL), according to the sediment quality criteria for the classification of sediments developed by the Hong Kong SAR Government (ETWB, 2002). 151

Table IV-3 : Relative abundance of SRP among the total bacterial community and common SRB OTUs between EDB1 and SL mats. 1) based on 16S rDNA MiSeq sequences, % of reads affiliated to SRP, 2) based on <i>dsrB</i> MiSeq sequences, 3) based on genes, 4) based on transcripts, 5) relative abundance of reads included in the common OTUs.....	152
--	-----

CHAPITRE V : Diversité et structure des microorganismes fixateurs de carbone au sein du tapis microbien

Figure V-1: Abondances des gènes <i>nifH</i> , <i>cbbLGL</i> , <i>cbbM</i> et <i>mcrA</i> données en nombre de copies par gramme de sédiments sec de chaque site. <LD : inférieur à la limite de détection.	174
Figure V-2: Cluster des OTUs des séquences peptidiques de CbbLGL et CbbM selon la distance de Bray Curtis.....	176
Figure V-3: Analyses canoniques de correspondance (CCA) parcimonieuse montrant l'influence du pH sur la distribution des communautés de CbbL-GL (a) et CbbM (b).	176
Figure V-4: Arbre phylogénétique des séquences de référence des OTUs les plus abondants affiliés au gène <i>cbbLGL</i> « green-like » avec leurs plus proches parents cultivables. Leurs abondances sont représentées par un heatmap. L'arbre phylogénétique a été généré avec l'algorithme du neighbor joining avec 1000 répétitions de bootstrap.	178
Figure V-5 : Arbre phylogénétique des séquences de références des 50 OTUs les plus abondants affiliés au gène <i>cbbM</i> avec leurs abondances relatives représentées par un heatmap. L'arbre phylogénétique a été calculé avec l'algorithme du neighbor joining avec 1000 répétitions de bootstrap.	180
Table V-1 : Indices de diversité et de richesse des gènes <i>cbbL</i> et <i>cbbM</i> obtenus à partir des OTU définis à 100% d'identités en acides aminés.....	175

CHAPITRE VI : Conclusions et perspectives

Figure VI-1: Observation des changements de la composition d'un pétrole et de l'abondance des organismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures en fonction du temps suite à une contamination pétrolière (Head <i>et al.</i> , 2006)	190
---	-----

ANNEXES

Figure S1 : The map of Berre lagoon and adjacent areas showing the location of both sampling sites (EDB1 and SL).	205
Figure S2: Rarefaction curves of sulfate-reducing isolates diversity based on 3% cutoff for both sites. Vertical bars represent the 95% confidence intervals.	206
Figure S3 : Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of isolates from EDB1 (orange) and SL (blue) sampling station in the Berre lagoon. The tree was constructed using the neighbour-joining methods with bootstrap values based on 1000 replicates.	207
Table S1 : The new taxa isolated from Berre lagoon based on 97% similarity for species delineation	208

Table S2 : Functional distribution of sulfate-reducers genes and transcripts according to Kegg classification.	209
--	-----

- INTRODUCTION GENERALE -

INTRODUCTION GENERALE

Les microorganismes représentent environ un tiers de la biomasse totale sur Terre et sont à la base du fonctionnement de la biosphère (Kallmeyer *et al.*, 2012). Ils présentent une diversité métabolique remarquable leur conférant une grande adaptabilité pour coloniser tout type d'environnement. Les bactéries sont capables de détecter rapidement un changement dans leur environnement et d'adapter leur métabolisme à ce changement. De plus, les bactéries vivent en communauté et interagissent entre elles, ces relations pouvant être positives ou négatives. Elles cumulent différentes capacités métaboliques rendant possible la colonisation d'environnements variés. Ainsi, la communauté va pouvoir répondre à des diminutions d'apport en nutriments, utiliser une large gamme de sources d'énergies et faire face aux conditions physico-chimiques changeantes du milieu. Elles maintiennent un équilibre dans leurs interactions qui déterminent la structure et le fonctionnement de la communauté. Les tapis microbiens photosynthétiques sont un exemple de ces communautés. Ils font preuve d'une grande diversité et versatilité métabolique ayant ainsi un rôle clé dans les cycles biogéochimiques. Ces structures considérées comme les plus vieux écosystèmes structurés existant sur Terre, témoignent d'une grande capacité d'adaptation. Leur ubiquité et leur capacité à se développer en présence de polluant en font des systèmes d'études très intéressants.

L'homme perturbe les cycles biogéochimiques en introduisant des résidus toxiques dans l'environnement. Le pétrole est la source d'énergie la plus utilisée sur Terre, ce qui en fait le polluant organique le plus important en terme quantitatif dans les milieux marins, les environnements côtiers figurant parmi les plus touchés par ces pollutions. Le pétrole est lent à être dégradé et contient des composés toxiques. Les bactéries de par leur ubiquité et leur important potentiel métabolique, ont mis au point des mécanismes de dégradation, de résistance et d'adaptation à ces polluants. En effet au sein d'un consortium bactérien les activités métaboliques des différents groupes de bactéries présents sont en interrelations et permettent de dégrader un plus grand nombre d'hydrocarbures de façon séquentielle. Ainsi le pétrole peut être à la fois source de carbone, induire des changements physico-chimiques de l'environnement et être toxique. Les tapis microbiens photosynthétiques se développent en zones côtières particulièrement touchées par les pollutions aux hydrocarbures ; ils ont d'ailleurs recolonisé des zones recouvertes par le pétrole. La grande diversité de microorganismes à l'échelle de quelques millimètres rend les tapis microbiens d'un intérêt

particulier pour les processus de biodégradation. Le pétrole peut également affecter les organismes formant le tapis et modifier la structure métabolique et le fonctionnement du tapis, il peut ainsi induire des modifications dans les cycles biogéochimiques.

L'objectif de ce travail est de comprendre, aux niveaux structural et fonctionnel, l'assemblage des tapis microbiens et le rôle joué par la contamination pétrolière dans la structuration des communautés qui les composent. Le travail présenté s'intéresse à l'étude des communautés d'un tapis microbien présentant une contamination chronique et ancienne et à sa comparaison avec des communautés issues d'un site moins contaminé présentant des paramètres physico-chimiques proches. De par le rôle important de la lumière et des modifications annuelles sur le tapis, les variations engendrées par la fluctuation de ces paramètres ont été prises en compte dans cette étude. L'étude porte sur deux tapis échantillonnés sur quatre périodes, réparties sur deux saisons : printemps et début d'automne. Pour une des saisons de printemps les variations nyctémérales ont été prises en compte par des prélèvements jour/nuit.

Le chapitre III apporte une description globale des deux tapis, de leurs diversités phylogénétiques et métaboliques au travers de méthodes moléculaires par l'analyse d'un marqueur moléculaire ciblant les bactéries et les archées. De plus, une méthode systématique permet de décrire les métabolismes dominants des tapis microbiens et ceux exprimés différemment en fonction des conditions environnementale

Dans les chapitres suivants, l'étude se positionne au niveau des groupes fonctionnels. Le chapitre IV s'intéresse aux microorganismes impliqués dans le cycle du soufre de par son abondance dans les sédiments marins et met un accent particulier sur les bactéries sulfato-réductrices (BSR) de par leur rôle important dans la dégradation de la matière organique en milieu marin. Pour ce groupe particulier, une étude jour/nuit a été réalisée sur les communautés métaboliquement actives afin de déterminer l'effet des variations nyctémérales sur les sulfato-réducteurs. Un regard particulier sur leur métabolisme est porté de par la capacité de certaines souches de sulfato-réducteurs à dégrader les hydrocarbures.

Le chapitre V s'intéresse pour sa part aux cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote. Une quantification des marqueurs fonctionnels impliqués dans ces deux cycles est réalisée et la diversité des microorganismes fixateurs de carbone, un processus clé dans les tapis microbiens, est étudiée en ciblant le gène de la RuBisCO. Ce dernier chapitre vient

compléter l'image des principaux cycles biogéochimiques présents dans les tapis et des microorganismes associés.

Ce travail de recherche s'inscrit dans le projet de recherche FUNHYMAT (Structure et fonctionnement de tapis microbiens contaminés avec des hydrocarbures) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Ce projet est à la convergence de plusieurs spécialités. Il associe ainsi plusieurs partenaires : l'Equipe Environnement et Microbiologie (EEM) et le Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE) de l'IPREM, le Laboratoire de Mathématiques et leurs Applications (LMA) de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour; la plateforme génomique et la plateforme bioinformatique de Toulouse Genotoul ; l'Institut Méditerranéen d'Océanographie (MIO) de l'Université d'Aix-Marseille; le laboratoire d'ECologie des SYstèmes Marins côtiers (ECOSYM) de l'Université Montpellier 2.

- CHAPITRE I –
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES TAPIS MICROBIENS PHOTOSYNTHÉTIQUES

Les tapis microbiens sont des structures complexes et stratifiées de microorganismes adhérant entre eux et à un substrat. La stratification des tapis microbiens est observable à l'œil nu grâce aux pigments photosynthétiques des bactéries les composant. Ils peuvent être composés de centaines à plusieurs milliers d'espèces différentes organisées en plusieurs couches (Bolhuis & Stal, 2011; Paissé *et al.*, 2008) et présentent des diversités phylogénétique et fonctionnelle extraordinaire pouvant contenir jusqu'à 42 phyla différents incluant beaucoup de divisions candidates (Burow *et al.*, 2013; Ley *et al.*, 2006). Les tapis microbiens se forment à l'interface eau-sédiment (Stal, 1994) ; leur épaisseur est très variable et peut aller d'un à plus d'une dizaine de centimètres (Franks & Stolz, 2009). On peut les retrouver dans des milieux peu profonds tels que les estuaires, les lagunes, au niveau des sources chaudes mais également dans les grands fonds océaniques au niveau des sources hydrothermales (Figure I-1)(Franks & Stolz, 2009). Les tapis se structurent selon des gradients physico-chimiques d'oxygène, de pH et de sulfures. Le système est très bien structuré grâce à des métabolismes qui interagissent entre eux. Les gradients vont déterminer l'assemblage des communautés, qui, du fait des métabolismes des bactéries les composant, vont à leur tour affecter les gradients et donc les cycles biogéochimiques (Figure I-2). La description qui va suivre va être ciblée sur les tapis photosynthétiques qui s'organisent également selon un gradient de lumière (van Gemerden, 1993; Revsbech *et al.*, 1983).

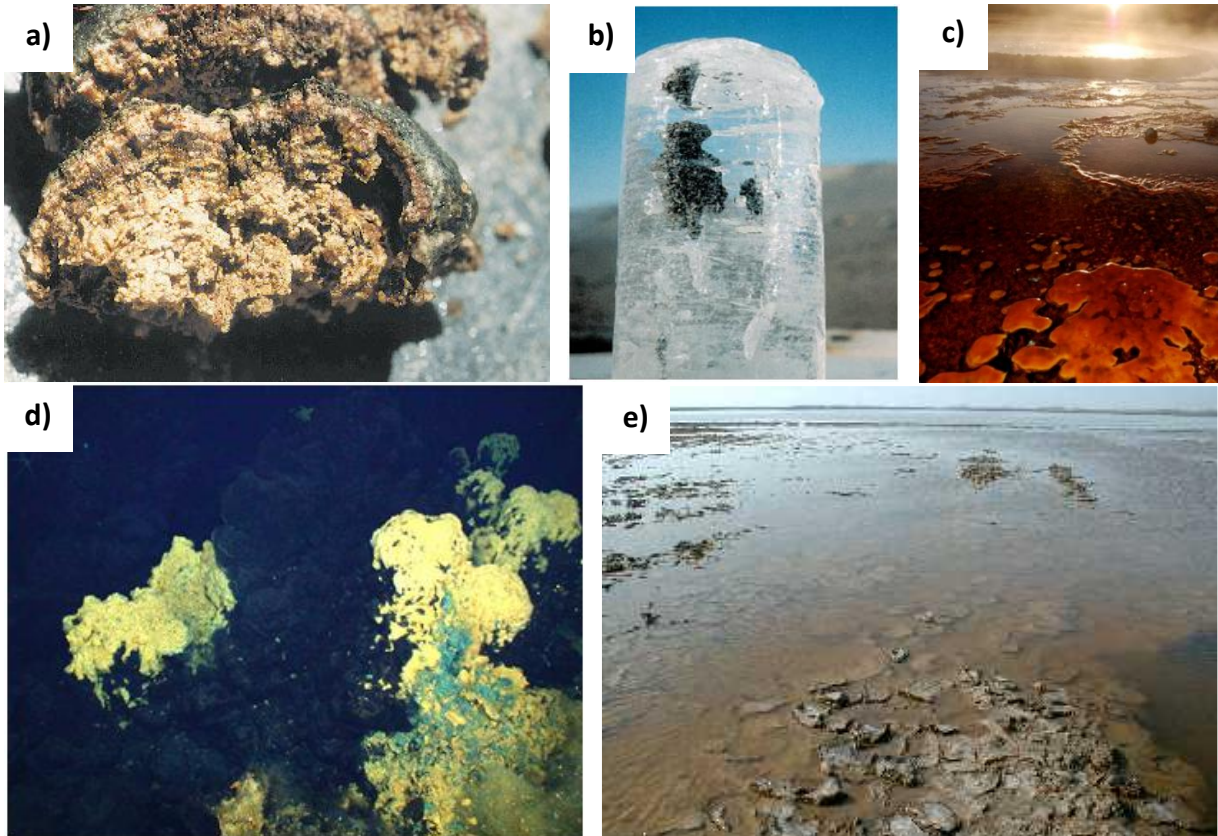


Figure I-1: Photographies de tapis microbiens colonisant différents environnements : section transversale d'un stromatolithe recouvert par un tapis microbiens actif (a) ; carotte de glace (1,5 m de haut) issue du lac de Bonney en Antarctique contenant un tapis microbien (b) ; tapis microbiens dans une source chaude du parc national du Yellowstone (c), au niveau de sources hydrothermales profondes (d) et dans les marais salants de Camargue (e). Les photos (a) et (b) sont tirées d'une publication de Paerl *et al.*, (2000). La photo (e) a été prise par les membres de l'équipe environnement et microbiologie de l'IPREM (Pau, France). Les photos (c) et (d) sont issues des sites internet : (c), <http://www.astrobio.net/pressrelease/3500/triangulating-photosynthesis> et (d), <http://www.soest.hawaii.edu/expeditions/mariana/dailyupdates-40.htm>.

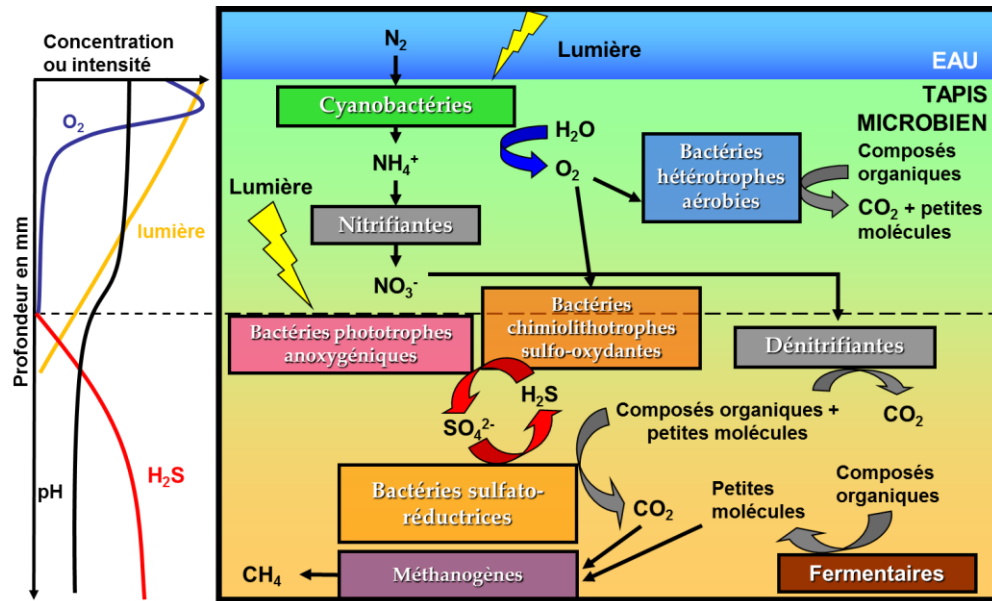


Figure I-2: Schéma simplifié d'un tapis microbien photosynthétique et des relations entre bactéries, associées aux gradients de lumière, d'O₂, de pH et d'H₂S en journée (modifié d'après Bordenave (2007)).

1.1. Les groupes microbiens fonctionnels majeurs structurant les tapis microbiens

1.1.1. Les phototrophes oxygéniques

Le groupe majeur, précurseur des tapis, est celui des cyanobactéries filamenteuses ou unicellulaires, situées à la surface des tapis constituant une couche jaune/verte. Ce sont les seuls procaryotes connus capables de réaliser une photosynthèse oxygénique utilisant l'H₂O comme donneur d'électrons, produisant ainsi du dioxygène. Elles permettent l'apport d'oxygène, d'azote et de matière organique au sein du tapis pour le développement des autres espèces bactériennes (Stal, 1994) et sont également capables de réaliser des fermentations en absence de lumière et d'oxygène. La capacité à fixer le diazote permet aux cyanobactéries de coloniser des environnements pauvres en nutriments, en particulier en azote, dans lesquels les tapis microbiens prospèrent. L'apport d'azote est d'une importance particulière au sein des jeunes tapis : il est remplacé par l'apport de carbone organique dans les tapis matures (Severin *et al.*, 2010). *Oscillatoria* sp. et *Spirulina* sp. sont des espèces pionnières des tapis microbiens (Franks & Stolz, 2009). Elles se retrouvent remplacées ensuite par des espèces telles que *Microcoleus chthonoplastes* et *Lyngbya aestuarii* qui sont prédominantes au sein des tapis matures de zones intertidales (van Gemerden, 1993). Les genres *Spirulina*, *Gloeotheca* et *Merismopedia* ont également été retrouvés au sein de tapis microbiens photosynthétiques (Severin *et al.*, 2010). Les cyanobactéries excrètent des exopolysaccharides (EPS), et forment

une matrice autour des bactéries. Cette gaine polysaccharidique est composée de carbohydrates, de protéines et d'autres composés à de plus faibles proportions. Elle contribue à la stabilisation du tapis microbien en se liant aux particules de sédiments, et prévient les phénomènes d'érosion (Dade *et al.*, 1990; Decho, 1990). Au sein du groupe des phototrophes oxygéniques, on observe la présence d'eucaryotes photosynthétiques tels que les diatomées, qui apportent elles aussi une source d'azote et de carbone au tapis microbien (Hubas *et al.*, 2011).

1.1.2. Les bactéries hétérotrophes aérobies

Les bactéries hétérotrophes aérobies (BHA) profitent de l'oxygène et de la matière organique apportés par les cyanobactéries pour réaliser leur respiration aérobie (Marshall, 1989). Elles ont une fonction importante au sein du tapis : leurs activités mènent à la diminution de la concentration en oxygène, toxique pour les espèces bactériennes situées en profondeur dans le tapis (van Gemerden, 1993). Elles dégradent également la matière organique de par leurs activités de respiration aérobie.

1.1.3. Les bactéries chimiolithotrophes sulfo-oxydantes

Les bactéries chimiolithotrophes sulfo-oxydantes (BCSO), qualifiées de bactéries sulfo-oxydantes incolores par opposition aux bactéries phototrophes sulfo-oxydantes pourpres ou vertes, se trouvent à l'interface des zones oxiques-anoxiques où sont présents à la fois l'oxygène et les sulfures. Le sulfure, ainsi que les autres composés inorganiques soufrés réduits, sont utilisés comme donneurs d'électrons lors de la réduction du dioxyde de carbone en carbone organique. L'oxygène et le nitrate sont les accepteurs terminaux d'électrons de cette oxydation (van Gemerden, 1993). Certaines cellules stockent ces nitrates intracellulairement. L'oxydation des sulfures est réalisée par des bactéries présentes au sein des classes des *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-* et *Epsilonproteobacteria* et par des archées au sein de la famille des *Sulfolobales* (Kirchman, 2012). Il est possible de distinguer quatre groupes de BCSO selon les sources de carbone et d'énergie utilisées (Robertson & Kuenen, 2006) :

- Les chimiolithotrophes obligatoires tels que *Thiomicrospira*, *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus* et *Sulfolobus* utilisent comme donneur d'électrons un composé minéral soufré et fixent le carbone *via* le cycle de Calvin. Elles peuvent néanmoins devenir hétérotrophes lorsque les conditions du milieu sont défavorables, mais ce métabolisme est secondaire.

- Les chimiolithotrophes facultatifs peuvent également croître en hétérotrophie ou en mixotrophie.
- Les chimiolitho-hétérotrophes représentés par quelques *Thiobacillus* et *Beggiatoa* ne fixent pas le carbone minéral et doivent disposer d'une source de carbone organique. Ils utilisent des composés soufrés réduits comme donneurs d'électrons et source d'énergie.
- Les chimio-organo hétérotrophes (certaines espèces de *Beggiatoa* sp., *Mecromonas*, *Thiobacterium* et *Thiotrix*) peuvent oxyder des composés soufrés sans en retirer de bénéfices énergétiques apparents.

Des tapis microbiens contenant des bactéries filamenteuses sulfo-oxydantes incolores tel que *Beggiatoa* spp., *Thioploca* spp., et *Thiomargarita namibiensis* ont été retrouvés à la surface de sédiments de zones côtières du bassin de Santa Barbara et ont également été observés au niveau de cheminées sous-marines, de volcans de boue, ainsi que des suintements de méthane et courants froids (Franks & Stolz, 2009). Le genre *Beggiatoa* est particulièrement présent dans les tapis microbiens (Martínez *et al.*, 1997). Ces bactéries sont adaptées aux variations géochimiques engendrées par les cycles nyctéméraux : en effet, les genres *Beggiatoa* et *Thiovulum* effectuent des migrations dans le tapis en suivant l'interface mobile de la zone oxique-anoxique (Garcia-Pichel *et al.*, 1994). La taille des filaments de ces bactéries peut être relativement importante et atteindre près de quelques micromètres de diamètre et jusqu'à une centaine de micromètres de longueur (Gallardo & Espinoza, 2007). Les études portant sur les bactéries chimiolithotrophes sulfo-oxydantes se sont majoritairement portées sur les bactéries filamenteuses tels que *Beggiatoa* ou *Thioploca*. Cependant d'autres microorganismes sont présents et contribuent à l'oxydation des sulfures dans les sédiments marins. Lenk *et al.*, (2011) ont mis en évidence un clade de *Gammaproteobacteria* non filamenteuses qui semblerait jouer un rôle important dans la production primaire et la sulfo-oxydation. Les bactéries chimiolithotrophes sulfo-oxydantes peuvent entrer en compétition avec les bactéries phototrophes anoxygéniques (BPA) pour le sulfure.

1.1.4. Les bactéries phototrophes anoxygéniques

Les BPA réalisent une photosynthèse anaérobie en utilisant les produits terminaux de la dégradation de la matière organique comme donneurs d'électrons. Dans les tapis microbiens, elles ont un rôle important dans les dernières étapes de la dégradation de la matière organique. Elles peuvent également utiliser comme donneurs d'électrons des composés soufrés réduits tels que les sulfures issus de la respiration du sulfate, le thiosulfate et le soufre élémentaire. Les BPA se différencient en six groupes qui diffèrent notamment par leur potentiel d'hétérotrophie et par leur tolérance à l'oxygène (Table I-1) (Kirchman, 2012) :

- Les bactéries pourpres sulfureuses sont retrouvées chez les *Gammaproteobacteria* au sein des *Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae* et des *Halorhodospiraceae*. Elles utilisent principalement des donneurs d'électrons soufrés (sulfures, polysulfures, soufre élémentaire, thiosulfate, sulfite).

- Les bactéries pourpres non sulfureuses sont retrouvées au sein des *Beta-* (*Rhodofera*, *Rubrivivax*, etc.) et *Alphaproteobacteria* (*Rhodospirillum*, *Rhodobacter*, etc.). En conditions anaérobies et en présence de lumière, les phototrophes pourpres non sulfureuses utilisent préférentiellement des composés organiques comme donneurs d'électrons, mais elles sont capables de photo-lithotrophie en utilisant l'hydrogène ou des composés soufrés réduits.

- Les bactéries pourpres aérobies sont des bactéries hétérotrophes où la photosynthèse ne constitue qu'un métabolisme énergétique annexe.

- Les bactéries vertes sulfureuses présentes au sein des *Chlorobi* sont anaérobies strictes et photolitho-autotrophes. Quelques composés organiques simples sont photoassimilés en présence de CO₂ et de sulfures.

- Les bactéries vertes filamenteuses peuvent se déplacer par glissement. Elles se retrouvent au sein des *Chloroflexi*. Ces bactéries aérobies facultatives utilisent préférentiellement des composés organiques selon un métabolisme phototrophe ou chimiotrophe, les composés soufrés réduits étant peu utilisés.

- Les héliobactéries sont présentes au sein des *Firmicutes* (Frigaard & Dahl, 2008; Kirchman, 2012). Elles possèdent des bactériochlorophylles g mais ne sont pas capable de fixer le carbone et de réaliser une croissance autotrophe ; ce sont des anaérobies stricts photo-organotrophe ou fermentaires.

Table I-1: Les différents groupes de bactéries phototrophes anoxygéniques et leurs caractéristiques principales, modifié d'après Bertrand *et al.* (2011). (a) Les donneurs d'électrons accessoires sont cités entre parenthèses.

Micro-organismes phototrophes	Pigments photosynthétiques	Donneurs d'électrons (a)	Source de carbone
Bactéries pourpres sulfureuses - <i>Chromatiaceae</i> - <i>Ectothiorhodospiraceae</i>	Bchl. <i>a/b</i> caroténoïdes	H ₂ S /S ⁰ /S ₂ O ₃ ²⁻ /H ₂ (Organique)	CO ₂ Organique
Bactéries pourpres non-sulfureuses	Bchl. <i>a/b</i> caroténoïdes	Organique (H ₂ S /S ⁰ /S ₂ O ₃ ²⁻ /H ₂)	Organique CO ₂
Bactéries pourpres aérobies	Bchl. <i>a/(b)</i> caroténoïdes	Organique	Organique
Bactéries vertes sulfureuses	Bchl. <i>c/d/e</i> caroténoïdes	H ₂ S /S ⁰ /H ₂	CO ₂
Bactéries vertes filamenteuses	Bchl. <i>c/d</i> caroténoïdes	Organique (H ₂ S /S ⁰ /H ₂)	Organique CO ₂
<i>Heliobacteriaceae</i>	Bchl. <i>g</i> caroténoïdes (neurosporène)	Organique	Organique

Les bactériochlorophylles des bactéries pourpres (Bchl. a et b), vertes (Bchl. c, d, e) et des héliobactéries (Bchl g) n'absorbent pas les radiation lumineuses de la même longueur d'onde (Pfennig, 1967). Ainsi, on peut observer au sein d'un tapis microbien une stratification verticale de ces bactéries phototrophes anoxygéniques, les bactéries pourpres se localisant au-dessus des bactéries vertes. Cette stratification colorée est parfois observable à l'œil nu, la couche rose est due à la présence des phototrophes pourpres parmi lesquelles on peut observer *Amoebobacter* sp., *Thiocapsa roseopersarcina*, *Thiocapsa pfennigii*, *Thiopedia* sp., *Chromatium* sp., et *Ectothiorhodospira* sp. La couche verte est due à la présence des phototrophes vertes telles que *Prostheocochloris estuarii* (Franks & Stolz, 2009). Un clade de *Rosebacter* a été également trouvé dominant sur le tapis microbien de l'étang de Berre par Ranchou-Peyruse *et al.*, (2006) tandis que le genre *Chlorofexi* a été retrouvé particulièrement actif au sein des tapis microbiens de l'estuaire de l'Elkorn Slough (USA) (Burow *et al.*, 2013). Dans ces écosystèmes de milieux peu profonds, les bactéries phototrophes sulfo-oxydantes pourpres sont retrouvées plus fréquemment que les autres bactéries phototrophes anoxygéniques. En effet, les radiations lumineuses sont rapidement atténuées par l'épaisseur des sédiments ainsi que par la présence des cyanobactéries et des algues, laissant surtout « passer » les longueurs d'ondes élevées (proche infra-rouge). Ces radiations permettent le développement des bactéries phototrophes sulfo-oxydantes pourpres dont les pigments

absorbent à 800-850 nm (Jørgensen & Des Marais, 1986). De plus, les bactéries vertes sulfureuses sont non tolérantes à l'oxygène et sont moins adaptées aux fluctuations des gradients d'oxygène. De ce fait, elles sont donc moins observées dans les tapis microbiens (van Gemerden, 1993).

Les bactéries chimiolithotrophes sulfo-oxydantes phototrophes et incolores consomment les sulfures issus du métabolisme des bactéries sulfato-réductrices (BSR). Ainsi, seul moins de 1% du sulfure produit par les bactéries sulfato-réductrices atteindra l'atmosphère (van Gemerden, 1993).

1.1.5. Les bactéries sulfato-réductrices

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) se développent dans la zone anoxique, en dessous des BPA, en utilisant les composés organiques comme donneurs d'électrons et sources de carbone, et le sulfate comme accepteur terminal d'électrons. D'autres composés soufrés moins oxydés que le sulfate tels que le sulfite, thiosulfate et le soufre peuvent également être utilisés comme accepteurs d'électrons. Ces bactéries jouent un rôle important dans la minéralisation de la matière organique dans les environnements anoxiques (Ollivier *et al.*, 1994). Les substrats fréquemment utilisés par ces bactéries sont des composés de faible poids moléculaire provenant essentiellement de la fermentation de la matière organique, tels que les acides organiques simples (acétate, lactate, propionate, butyrate), les alcools (éthanol, propanol, butanol) et l'hydrogène (Widdel & Hansen, 1992). Les microorganismes sulfato-réducteurs sont classés en deux groupes selon leur capacité à oxyder les substrats organiques :

- Le groupe I, pour lequel l'oxydation à partir du lactate et de l'éthanol est incomplète et s'arrête au stade acétate ou acétate et propionate. C'est le cas de *Desulfovibrio desulfuricans* ou *Desulfomaculum nigrificans*.

- Le groupe II, pour lequel l'oxydation complète du substrat carboné aboutit à la formation de CO₂. C'est le cas de *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfomonas* ou *Desulfobacter* (Bertrand *et al.*, 2011).

Certaines bactéries sulfato-réductrices sont également capables d'utiliser des sources de carbone plus complexes telles que des acides gras à longues chaînes, des sucres (glucose, fructose), des composés aromatiques (benzoate, catéchol, indole, toluène) ou des hydrocarbures (Ollivier & Magot, 2005). La respiration dissimilatrice du sulfate entraîne la production de sulfure et la formation d'un gradient associé (Barton & Tomei, 1995) : Leur

activité mène à la précipitation de sulfure de fer, reconnaissable dans le tapis par sa coloration noire.

Sur le plan taxonomique, les bactéries sulfato-réductrices sont retrouvées majoritairement chez les *Deltaproteobacteria* au sein des ordres des *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* et *Syntrophobacterales* (Figure I-3). On les retrouve également dans le phylum des *Firmicutes* et au sein des *Nitrospirae*. Des sulfato-réducteurs sont présents chez les archées au sein des genres *Archeoglobus*, *Thermocladium* et *Caldivirga*. Cette capacité à respirer le sulfate chez certaines archées serait lié à un transfert horizontal de gène (Wagner *et al.*, 1998). Les genres *Desulfobacterium* spp., *Desulfosarcina* spp., *Desulfococcus* spp. et *Desulfotignum* spp. appartenant aux *Desulfobacterales* ont été décrits dans les tapis microbiens de l'étang de Berre (Hernandez-Raquet *et al.*, 2006; Paissé *et al.*, 2008).

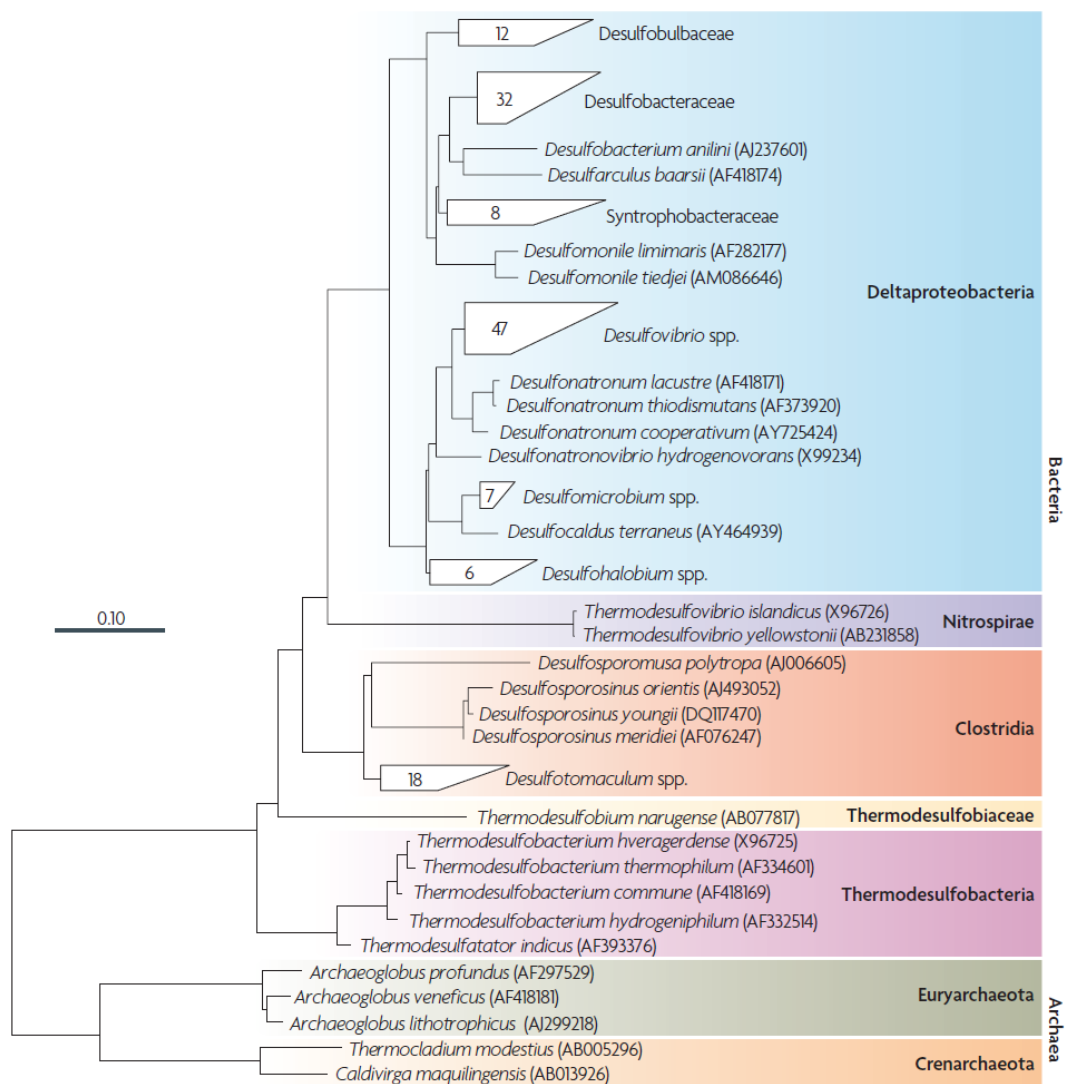


Figure I-3 Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ARNr 16S des espèces de sulfato-réducteur décrites d'après Muyzer & Stams (2008).

1.1.6. Les méthanogènes

Les procaryotes méthanogènes sont des anaérobies stricts qui sont exclusivement présents chez les archées et sont tous réunis dans le phylum *Euryarchaeota*. Il existe sept ordres connus de méthanogènes ; les *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* et *Methanosarcinales* sont communes des environnements anoxiques (Kirchman, 2012). Les *Methanococcales* sont des méthanogènes marins légèrement halophiles tandis que les *Methanopyrales* sont des hyperthermophiles qui ne comportent actuellement qu'un seul genre et une seule espèce décrite (Vandecasteele, 2005). Les ordres *Methanocellales*, et *Methanomassiliicocales* ont été décrits plus tardivement (Paul *et al.*, 2012; Sakai *et al.*, 2008). Les archées méthanogènes dominent la dernière étape de dégradation de la matière organique pour former du méthane lorsque les autres accepteurs d'électrons sont absents (dioxygène, nitrate, fer ferrique et sulfate). Elles utilisent principalement des composés carbonés très simples à 1 ou 2 atomes de carbone (méthanol, formate, acétate, méthylamines) certaines peuvent également utiliser la choline, la glycine ou la betaine (Watkins *et al.*, 2012, 2014) tandis que d'autres peuvent également respirer le CO₂ en utilisant l'hydrogène comme substrat. Les méthanogènes sont défavorisés lorsqu'ils entrent en compétition avec les sulfato-réducteurs pour des substrats tels que l'acétate et l'hydrogène pour des raisons thermodynamiques. Dans les sédiments marins où les sulfates sont présents, la méthanogénèse persiste en utilisant des substrats non compétitifs tels que les méthylamines, diméthylsulfoniopropionates et diméthylsulfides qui ne sont pas facilement utilisables par les sulfato-réducteurs et qui sont présents en concentrations élevées dans les tapis microbiens (Bolhuis & Stal, 2011). Les tapis hypersalés peuvent présenter des taux élevés de production de méthane (Hoehler *et al.*, 2001). Les classes *Methanomicrobia* et *Methanobacteria* étaient dominantes dans la population *Archaea* des tapis microbiens de l'île de Schiermonnikoog (Pays-Bas) (Bolhuis & Stal, 2011).

1.1.7. Les bactéries fermentaires

Les bactéries fermentaires jouent un rôle important dans les tapis microbiens au niveau fonctionnel. Elles réalisent les étapes préliminaires de la dégradation de la matière organique et fournissent des substrats aux bactéries sulfato-réductrices. La capacité de fermenter est largement répandue au sein des bactéries et des archées. De récentes études portant sur les tapis microbiens de Elkhorn Slough dans la baie de Monterey (USA) ont montré que

Microcoleus sp., le groupe cyanobactérien le plus abondant de ce tapis, faisait partie des principaux fermenteurs (Burow *et al.*, 2013).

1.1.8. Les autres groupes fonctionnels

Les bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes sont également présentes au sein des tapis microbiens (van Gemerden, 1993). La dénitrification est réalisée par des bactéries hétérotrophes anaérobies facultatives qui peuvent utiliser les nitrates ou les nitrites comme accepteur terminal d'électrons pour la respiration et les réduire en oxyde nitreux ou diazote (*Pseudomonas* sp., *Marinobacter* sp.). D'autres microorganismes tels que les bactéries ferri-réductrices ou ferro-oxydantes sont aussi présents.

1.2. Structure verticale et cycles biogéochimiques des tapis microbiens

1.2.1. Les gradients physico-chimiques

La diversité des métabolismes présents au sein des tapis microbiens induit la formation de microgradients physico-chimiques (Figure I-4). En journée, les radiations lumineuses pénètrent dans le tapis et sont atténuées par l'absorption par les organismes photosynthétiques et la matière organique, il s'en suit un gradient de lumière. L'activité photosynthétique des cyanobactéries et des micro-algues en surface induit une forte concentration d'oxygène dans les premiers millimètres du tapis, le maximum de production nette d'oxygène étant généralement atteint en milieu de journée (Visscher *et al.*, 1998). Il y a cependant des cas où le pic de production se fait en fin de matinée à cause de l'inhibition liée à de trop fortes intensités lumineuses (Franks & Stolz, 2009). L'oxygène est ensuite consommé par les bactéries hétérotrophes aérobies, ce qui entraîne une diminution de la concentration en oxygène en profondeur dans le tapis (Marshall, 1989). L'activité de sulfato-réduction des BSR crée un gradient de sulfure avec un maximum en profondeur du tapis. Ce sulfure, toxique pour la plupart des bactéries, est consommé par les bactéries sulfo-oxydantes et sa concentration diminue pour devenir nulle en surface. Le pH, quant à lui, augmente en surface sous l'action des cyanobactéries à cause du faible pouvoir tampon du tapis microbien et diminue en profondeur en avec la production de sulfure (Wieland *et al.*, 2005). Ces différents gradients sont sensibles au cycle nyctéméral du fait de l'absence de photosynthèse la nuit. La concentration en oxygène devient nulle pendant la nuit et le sulfure envahit la totalité du tapis réduisant le pH. En parallèle de ces gradients, on observe des mouvements bactériens verticaux tels que les BSR et certaines bactéries sulfo-oxydantes incolores qui remontent pendant la nuit en suivant le gradient de sulfure (Revsbech *et al.*, 1983).

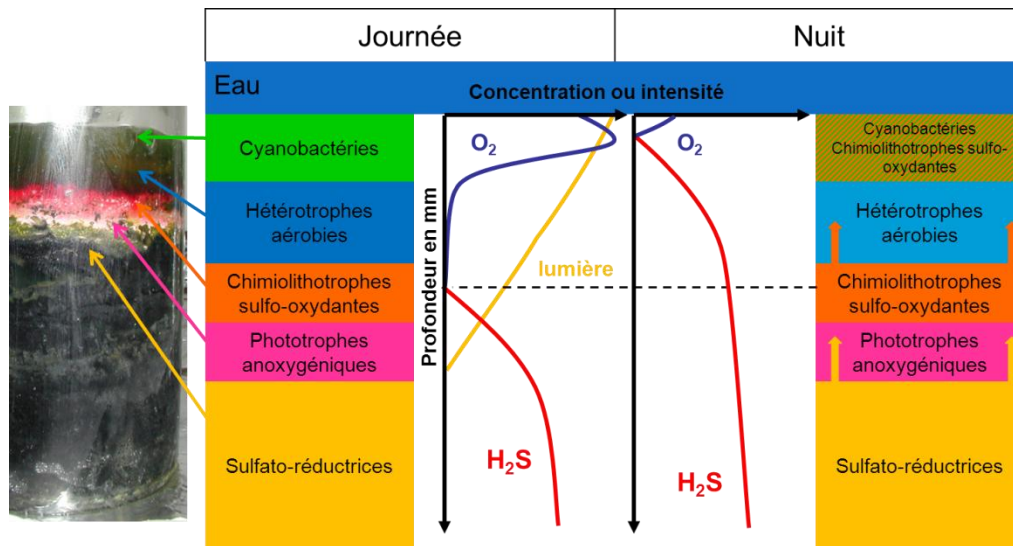


Figure I-4: Représentation schématique de l'organisation des principales communautés bactériennes au sein d'un tapis microbien, en fonction des gradients physico-chimiques d'oxygène, de sulfure et de lumière modifié d'après van Gemerden (1993) et Paisee (2009).

1.2.2. Les cycles biogéochimiques

1.2.2.1. Le cycle du carbone

Deux mécanismes majeurs vont participer au cycle du carbone : la photosynthèse, qui permet la fixation du carbone, et la respiration ou la fermentation qui permettent la minéralisation du carbone et son retour dans l'atmosphère. La fixation du carbone est majoritairement réalisée par des cyanobactéries ou des bactéries chimolithotrophes sulfo-oxydantes (Figure I-5)(Canfield & Des Marais, 1993). Le recyclage du carbone organique est réalisé en aérobiose par les bactéries hétérotrophes aérobies et en anaérobiose par des fermentaires, des BSR et des dénitrifiantes. Cette dégradation conduit à la formation de CO₂ et de biomasse. Les archées méthanogènes participent également à la dégradation de la matière organique en produisant du dioxyde de carbone et du méthane qui peut être à son tour oxydé en CO₂.

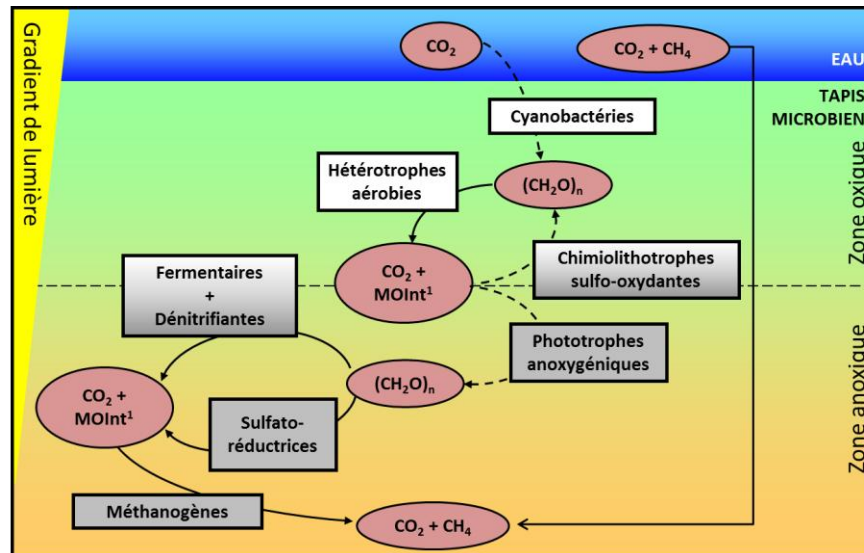


Figure I-5: Cycle simplifié du carbone dans un tapis microbien, les processus de fixation du carbone sont indiqués en flèches pointillées et ceux des dégradations en flèches pleines. MOInt : Matière organique intermédiaire. Modifié d'après Paissé (2009).

1.2.2.2. Le cycle du soufre

Le soufre est un élément essentiel pour les organismes vivants, il intervient dans la composition de composés organiques soufrés tels que les acides aminés (cystéine, méthionine), les protéines (ponts disulfures, centres réactionnels) et les coenzymes. Les métabolismes associés au cycle du soufre sont très importants dans les sédiments marins, du fait de la forte concentration en SO_4^{2-} dans l'eau de mer, la moitié de la minéralisation de la matière organique de cet environnement étant catalysée par les bactéries sulfato-réductrices (Jørgensen, 1982). Le soufre possède différents états d'oxydation de $-II$ (S^{2-}) à $+VI$ (SO_4^{2-}), les différentes espèces de soufre pouvant être utilisées comme donneurs ou accepteurs d'électrons. Ces processus sont majoritairement réalisés par des microorganismes. Le soufre réduit est utilisé comme source d'électrons par les chimolithotrophes sulfo-oxydantes en présence d'oxygène et par les photosynthétiques sulfureuses anoxygéniques (BPA) (Figure I-6). Quelques cyanobactéries peuvent également, en présence de sulfure inhibiteur du photosystème II, réaliser une photosynthèse anoxygénique identique à celle des BPA en métabolisant le sulfure (donneur d'électrons) grâce au photosystème I (Cohen *et al.*, 1975). Sous forme oxydée, le soufre est utilisé par les BSR ou les bactéries thiosulfato-réductrices comme accepteur d'électrons pour faire des respirations anaérobies ou la sulfato-réduction dissimilatrice (van Gemerden, 1993). Des composés soufrés, en particulier le sulfate, peuvent être réduits par les plantes, champignons ou bactéries afin d'être incorporés dans leur matériel cellulaire : il s'agit de la sulfato-réduction assimilatrice.

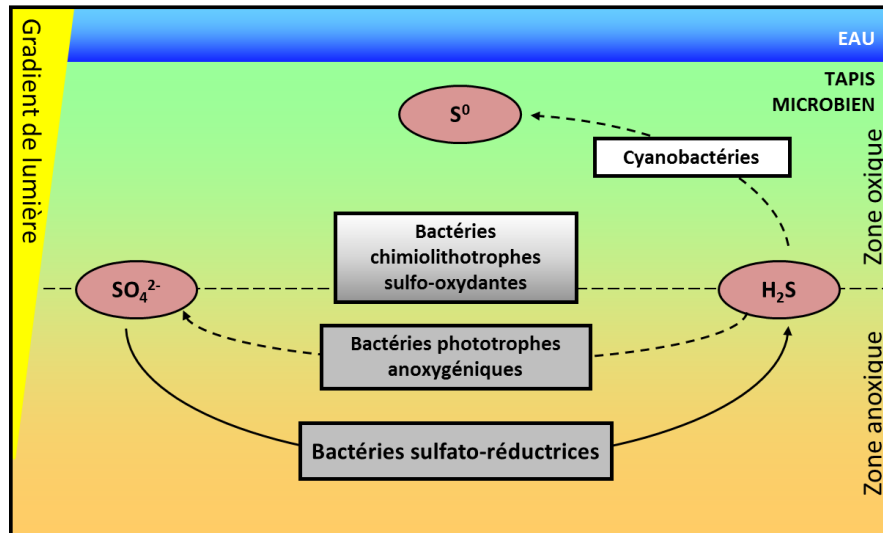


Figure I-6 : Cycle du soufre simplifié au sein des tapis microbiens. Les réactions de réduction sont indiquées en flèches pleines et celles d'oxydations en flèches pointillées. Modifié d'après Paissé (2009)

1.2.2.3. Le cycle de l'azote

L'azote, tout comme le soufre, a différents degrés d'oxydation qui lui permettent d'être utilisé comme donneur ou accepteur d'électrons. Ce nutriment est introduit dans les systèmes aquatiques par apport continental, par précipitations, par diffusion à partir des sédiments et par la fixation du N_2 atmosphérique par les microorganismes. De faibles concentrations en azote inorganique affectent la production primaire aquatique et par conséquent, toute la chaîne trophique. L'azote assimilable est un facteur limitant en milieu marin, d'où l'importance de la fixation du diazote. Les cyanobactéries sont considérées comme les principaux fixateurs dans le tapis microbien (Severin *et al.*, 2010) ; elles permettent la transformation de l'azote moléculaire en ammoniacque (assimilable par les microorganismes). D'autres bactéries telles que les BSR et BPA peuvent aussi y participer mais de façon moindre (Steppe & Paerl, 2005). La disponibilité en azote dans les tapis microbiens est l'un des principaux facteurs limitant de production primaire. Les processus d'ammonification, nitrification et dénitrification ont également lieu au sein de cet environnement (Paerl & Pinckney, 1996).

2. ADAPTATIONS DES TAPIS MICROBIENS

Les tapis microbiens sont probablement les plus vieux écosystèmes structurés existant sur Terre. Ils sont considérés comme les analogues récents des stromatolithes. Des microfossiles provenant de ces stromatolithes ont été datés à 3.5 milliards d'années (Margulis *et al.*, 1980). Ils ont dû faire état d'une grande versatilité pour traverser les crises majeures de l'histoire de la Terre. L'ubiquité et la présence des tapis microbiens depuis plusieurs millions d'années témoignent de cette qualité à s'adapter à des environnements variés et parfois hostiles.

2.1. Dynamique naturelle des tapis face aux stress environnementaux

Du fait de leur fonctionnement, les tapis microbiens sont assujettis à des gradients de lumière, d'oxygène et de sulfure durant les cycles nyctéméraux. Ces gradients peuvent être une source de stress pour les bactéries constituant les tapis. Ainsi de nombreux mécanismes d'adaptation ont été décrits, notamment pour les bactéries sulfato-réductrices. Ainsi les BSR s'adaptent à la présence d'oxygène produit par les cyanobactéries en journée grâce à des enzymes de détoxification (catalase, superoxyde dismutase), tandis que d'autres ont évolué métaboliquement, développant la capacité de respiration aérobie dans des conditions de microaérophilie (Krekeler *et al.*, 1998). Certaines BSR réalisent également des migrations vers des conditions optimales de croissance, notamment vers des zones plus réduites (Fourçans *et al.*, 2008). Ce chimiotactisme est également observé chez d'autres espèces bactériennes au sein de tapis microbiens : on peut prendre comme exemple les cyanobactéries qui présentent un hydrotactisme lorsqu'il y a dessiccation du tapis microbien (Pringault & Garcia-Pichel, 2004). D'autres mécanismes de résistance ont été décrits chez les BSR, comme la formation de spores (Cypionka *et al.*, 1985) ou d'agrégats. Ces agrégats sont observés chez *Desulfonema*, lorsque les bactéries se retrouvent en surface du tapis, ce qui permettrait ainsi la formation de micro-niches anoxiques (Sigalevich *et al.*, 2000).

Les tapis microbiens colonisent une large gamme de milieux, des milieux hypersalés aux environnements acides ou alcalins, en passant par des environnements supportant des températures inférieures à zéro ou supérieures à 80°C. Pour cela, les bactéries mettent en place différentes stratégies. Pour s'adapter au stress osmotique (Ollivier *et al.*, 1994), les bactéries colonisant le tapis réalisent des transports d'ions à travers leur membrane par des pompes ioniques ou produisent ou accumulent des molécules organiques à l'intérieur de la cellule. Les osmolytes organiques permettent en effet de maintenir la pression de turgescence

au sein des cellules soumises à un stress aux sels. Les cyanobactéries sont capables d'accumuler le sucrose et le thréalose pour faire face à ce stress (Ollivier *et al.*, 1994). Bien que certaines cellules aient développé ces stratégies, la salinité élevée induit une diminution de la diversité au niveau de la communauté (Casamayor *et al.*, 2002).

Les tapis ont globalement un effet protecteur sur les cellules qui les composent : en effet, les substances doivent diffuser dans la matrice compacte et leur concentration en profondeur est plus faible qu'à la surface. Dans le cas de toxiques, leurs efficacités seront d'autant plus réduites (Stewart & Costerton, 2001). De plus, l'association de différentes populations au sein du consortium permet la dégradation de molécules exogènes plus ou moins complexes, tels que les hydrocarbures, pouvant avoir un caractère toxique. Cette association est également indispensable à l'élimination de certains produits toxiques du métabolisme.

2.2. Dynamique des tapis microbiens face au pétrole

2.2.1. Origine et composition des pétroles

En terme quantitatif, les hydrocarbures pétroliers constituent le polluant organique le plus important des mers et des océans (Spormann & Widdel, 2000). Les hydrocarbures présents dans l'environnement peuvent être soit d'origine naturelle soit d'origine anthropique. Le pétrole est en effet formé à l'échelle des temps géologiques par transformation de matière organique (diagenèse, catagenèse et méthanogénèse) enfouie dans les sédiments (Widdel & Rabus, 2001). La majeure partie des pétroles en milieu marin provient de suintements naturels (Hornafius *et al.*, 1999; Prince *et al.*, 2003). Ces rejets sous forme liquide et gazeuse se répandent dans les mers et l'atmosphère. De nombreux hydrocarbures sont synthétisés par des organismes vivants (microorganismes, plantes et métazoaires). La diversité de ces hydrocarbures d'origine biogénique et l'échelle à laquelle ils sont produits sont considérables. Les émissions foliaires d'isoprènes et de terpènes sont par exemple estimées entre 600 et 800 Mt par an (Vandecasteele, 2005). Globalement, cette production d'hydrocarbures et de composés dérivés est importante pour sa participation au cycle du carbone et ses éventuelles applications industrielles. Certains hydrocarbures ont également une origine pyrolytique et peuvent provenir de feux de forêts et d'éruptions volcaniques (Lipiatou *et al.*, 1997). L'exploitation et l'utilisation du pétrole par l'homme induit également l'introduction d'hydrocarbures pétroliers dans l'environnement et notamment dans l'environnement marin (O'Rourke & Connolly, 2003). Bien que le bilan des différentes sources d'hydrocarbures

déversés en mer soit, au niveau planétaire, difficile à établir, le National Research Council (National Research Council, 2002) estime à $1,3 \cdot 10^6$ tonnes la quantité d'hydrocarbures pétroliers qui ont abouti dans le milieu marin pour la période de 1990 à 1999. Les libérations de pétrole lors des naufrages attirent l'attention du public mais constituent une faible partie du pétrole entrant dans l'environnement, seulement $1 \cdot 10^5$ tonnes pour la même période. La majorité des apports anthropiques de pétrole dans l'environnement est liée à sa consommation par les activités humaines (rejets industriels et urbains).

Le terme de pétrole couvre une très grande variété de compositions d'huiles formées par des mélanges d'hydrocarbures et de composés de structures apparentées (Figure I-7). Les hydrocarbures sont des molécules exclusivement constituées d'hydrogène et de carbone. Ces composés majoritaires des pétroles (environ 80%) peuvent être classés en hydrocarbures saturés, insaturés et aromatiques (Heider *et al.*, 1998). Parmi ces hydrocarbures aromatiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou polyaromatiques (HAP) peuvent représenter jusqu'à 45% en poids des hydrocarbures totaux selon les types de pétroles (Tissot & Welte, 1978). Les structures chimiques des résines et des asphaltènes sont complexes et en majorité inconnues (Harayama *et al.*, 1999). Ces deux fractions contiennent la plupart des hétéroéléments présents dans le pétrole. Ces hétéroéléments sont essentiellement représentés par l'azote, le soufre, l'oxygène, et en moindre quantité certains métaux comme le nickel et le vanadium. Les pétroles peuvent être de compositions très différentes. Les pétroles légers sont généralement riches en hydrocarbures saturés et en hydrocarbures aromatiques avec une faible proportion de résine et d'asphaltènes. Les pétroles lourds, qui résultent de la biodégradation de l'huile brute en conditions anoxiques, sont constitués pour leur part de bien plus faibles teneurs en hydrocarbures et d'une plus forte proportion de résines et d'asphaltènes (Head *et al.*, 2006).

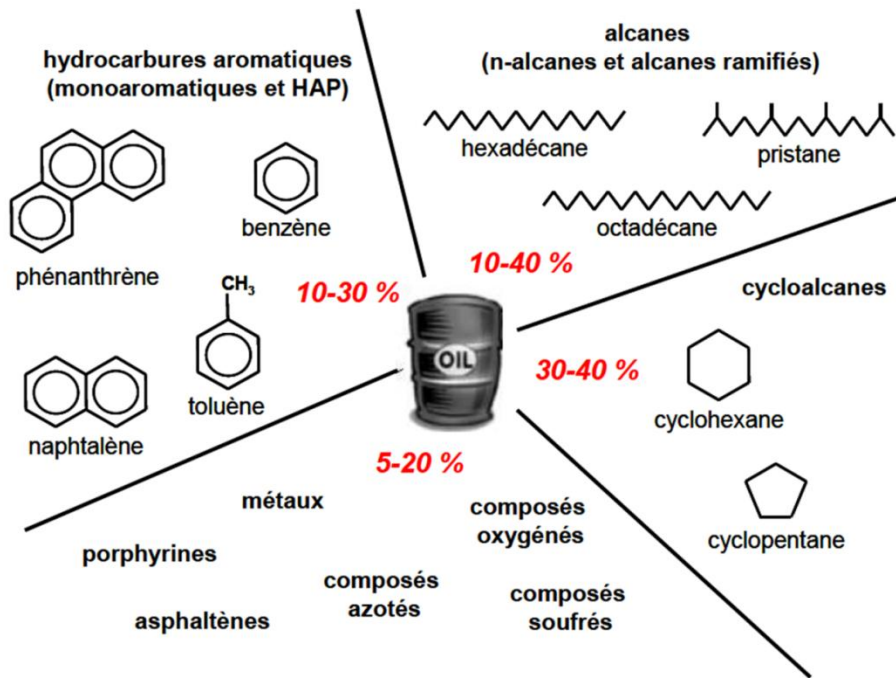


Figure I-7: Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules (Syakti, 2004).

2.2.2. Dégradations des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures est un processus déterminant pour le devenir des hydrocarbures en milieu marin (Leahy & Colwell, 1990). Elle est essentiellement réalisée par le métabolisme des microorganismes hétérotrophes, qu'il soit respiratoire ou fermentatif, et peut avoir lieu en aérobie et en anaérobie (Head *et al.*, 2006).

2.2.2.1. Biodégradation aérobie des hydrocarbures

Les bactéries marines hydrocarbonoclastes aérobies sont principalement des *Gammaproteobacteria* et certaines bactéries à Gram-positif (Head *et al.*, 2006). Les gènes de dégradation des hydrocarbures étant surtout portés par des éléments génétiques mobiles, toutes les souches de la même espèce ne sont pas capables de dégrader les hydrocarbures. De plus, les microorganismes ont en général une capacité de dégradation spécifique d'un type d'hydrocarbures (Berthe-Corti & Höpner, 2005). En aérobie, de nombreuses bactéries ont développé des systèmes enzymatiques permettant l'incorporation d'un ou deux atomes d'oxygène à la molécule cible, l'introduction de groupements polaires les rendant plus facilement dégradables par le métabolisme bactérien.

En condition aérobie dans la plupart des cas, les *n*-alcanes sont oxydés par des mono-oxygénases/hydrolases par l'incorporation d'un atome d'oxygène dans la molécule pour

former l'alcool primaire correspondant. L'attaque est le plus souvent terminale mais peut également s'effectuer en position biterminale ou subterminale. Le système enzymatique utilisé dépendra de la longueur de la chaîne carbonée de l'alcane. Après l'oxydation initiale de l'alcane, l'alcool correspondant est ensuite oxydé par une déshydrogénase pour former l'aldéhyde, puis l'acide gras qui servira de substrat pour l'acétyl CoA synthétase, pour être ensuite transformé par la voie de la β -oxydation (Van Beilen *et al.*, 2003).

Dans le cas des composés aromatiques, deux étapes clés interviennent dans la biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques, mono- ou polycycliques. La première est l'activation des noyaux benzéniques stables, par incorporation d'un ou deux atomes d'oxygène grâce à des mono-oxygénases et des dioxygénases, et la seconde étape correspond au clivage du noyau réalisé grâce à une enzyme du type extradiol- ou intradiol-dioxygénase. Les réactions enzymatiques suivantes entraînent la formation de métabolites qui seront ensuite transformés en intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques.

2.2.2.2. Biodégradation anaérobie des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures a longtemps été considérée comme uniquement aérobie, la capacité des bactéries à dégrader les hydrocarbures en absence d'oxygène n'ayant été démontrée que depuis les années 1980 (Kuhn *et al.*, 1985; Zeyer *et al.*, 1986). Ces microorganismes appartenant essentiellement aux *Proteobacteria* utilisent comme accepteur terminal d'électrons le nitrate, le sulfate ou le fer (Bertrand *et al.*, 2011; Hamme *et al.*, 2003; Widdel & Rabus, 2001). Dans les environnements anoxiques, l'absence d'oxygène implique une stratégie d'activation enzymatique spécifique : l'oxydation primaire des alcanes en anaérobiose se fait soit par addition de fumarate, soit par carboxylation (Figure I-8). Elle a été décrite pour des longueurs de chaîne carbonée comprises entre C₃ et C₂₀ (Grossi *et al.*, 2008). Pour les composés aromatiques, elle s'effectue soit par addition de fumarate, soit par déshydrogénation ou par carboxylation (Figure I-8).

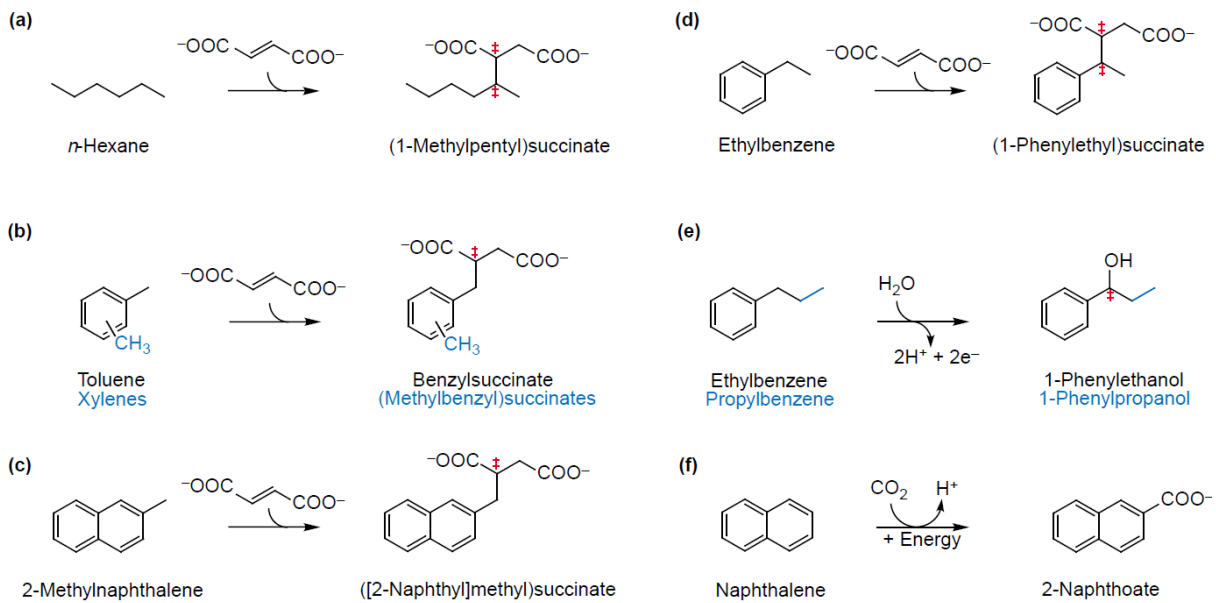


Figure I-8: Réaction initiale de dégradation anaérobie des hydrocarbures saturés et aromatiques. D'après Widdel & Rabus, (2001). Addition de fumarate (a,b,c,d), déshydrogénation (e) et carboxylation (f).

2.2.3. La réponse des tapis microbiens au pétrole

La seconde guerre du Golfe a conduit à la plus grande marée noire de l'histoire humaine, plus de 770 km de côtes furent recouvertes par du pétrole. Dans les années qui suivirent, des tapis microbiens photosynthétiques se développèrent sur ce pétrole (Barth, 2003). Depuis lors, l'impact d'une contamination par le pétrole sur des tapis microbiens a été étudié dans des expériences en microcosmes (Paissé *et al.*, 2012) et également dans des conditions naturelles (Paissé *et al.*, 2008). Le pétrole peut être toxique ou peut changer les conditions physico-chimiques du tapis. Il peut également être une source de carbone pour celui-ci. Les tapis microbiens, de par leur richesse spécifique et métabolique, constituent des systèmes de choix pour étudier les fonctions métaboliques et les processus de modification de structure des communautés, en réponse à une contamination pétrolière. La structure de la communauté bactérienne a été corrélée avec le niveau de contamination pétrolière. Différentes communautés ont été décrites sur des tapis microbiens contaminés : des populations métaboliquement actives dominées par des *Proteobacteria* (principalement *Gamma*- et *Alphaproteobacteria*) ont été décrites sur des tapis microbiens de suintements froids (Mills *et al.*, 2004) tandis que les communautés de tapis microbiens photosynthétiques présentaient également des bactéries associées aux *Alpha*-, *Epsilon*- et *Betaproteobacteria*, aux *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobium*, *Actinobacteria* et aux *Cyanobacteria* (Hernandez-Raquet *et al.*, 2006). Les contaminations au pétrole entraînent des réorganisations

dans la structure des communautés bactériennes (Bordenave *et al.*, 2007) ; la dominance de genres affiliés aux γ - et α -*proteobacteria* et aux *Bacilli* a été observée après des contaminations en condition de laboratoire. Cependant, l'impact d'une contamination sur une communauté bactérienne dépend de l'historique avec le contaminant et de la composition initiale de la communauté. La réponse du tapis sera plus rapide s'il ne s'agit pas d'une première exposition (Bordenave *et al.*, 2007).

2.2.3.1. Adaptation au pétrole des communautés de la phase oxique

Des taux élevés de photosynthèse ont été observés sur des tapis microbiens ayant connu une pollution ancienne. Cela peut résulter d'une augmentation de la disponibilité du CO₂, qui est due à la stimulation de la respiration des BHA et des BSR par l'apport d'oxygène. La stimulation des cyanobactéries par le pétrole n'est cependant pas clairement établie car le pétrole entraîne également certaines contraintes telles que la diminution de la pénétration de l'oxygène (Benthien *et al.*, 2004). Certaines études montrent que le pétrole brut a un effet délétère sur les cyanobactéries et ce, même à de faibles concentrations. Une étude *in situ* sur une pollution à long terme a montré que ces composés inhibaient la photosynthèse et la croissance, réduisaient l'activité enzymatique et induisaient des changements dans la composition des espèces de cyanobactéries (Megharaj *et al.*, 2000).

Le rôle des cyanobactéries dans la dégradation des hydrocarbures n'est pas bien établi. La structure polysaccharidique des tapis microbiens joue vraisemblablement un rôle important dans la dégradation des hydrocarbures, permettant leur adsorption et les rendant ainsi accessibles aux différentes communautés bactériennes présentes. Dans un tapis, les hydrocarbures sont principalement dégradés dans des conditions aérobies avec une forte implication des communautés supérieures du tapis, partie principalement constituée de cyanobactéries et de BHA (Abed *et al.*, 2002). Cette zone du tapis est considérée comme la partie la plus active au niveau du cycle du carbone. Certaines cyanobactéries semblent montrer des capacités de dégradation : la souche PCC 6803 de *Synechocystis* sp. possède le gène codant pour une dioxygénase, enzyme qui initie la dégradation des hydrocarbures aromatiques (Al-Hasan *et al.*, 1998). Les cyanobactéries *Anabaena cylindrica*, *Phormidium faveolarum*, et *Agmenellum quadruplicatum* ont également été décrites pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures (Cerniglia *et al.*, 1980b, a). En contrepartie, les résultats de certaines études ont montré que des cyanobactéries isolées de milieux contaminés ne présentent pas de capacité de dégradation (Chaillan *et al.*, 2006). De plus, de récentes études

sur des cyanobactéries hydrocarbonoclastes ont montré qu'elles n'étaient pas axéniques et qu'elles contenaient des bactéries hétérotrophes dans leurs mucilages (Abed *et al.*, 2002; Abed & Köster, 2005; Sánchez *et al.*, 2005). Par ailleurs, des bactéries affiliées aux genres *Marinobacter* et *Alcanivorax* bien caractérisées pour leurs capacités à dégrader les hydrocarbures font partie des BHA associées aux cyanobactéries (Abed *et al.*, 2007). Ainsi, les cyanobactéries joueraient plus un rôle indirect dans la dégradation des hydrocarbures en supportant l'activité et la croissance des dégradeurs (Abed & Köster, 2005). Les cyanobactéries et les BHA sont effectivement un bon modèle de consortium, les cyanobactéries fournissent l'oxygène, l'azote assimilable (Figure I-9) et des composés organiques aux dégradeurs, elles sécrètent des exsudats tels que du glucose ou des lipides qui ont un effet stimulateur sur la dégradation des hydrocarbures par les BHA.

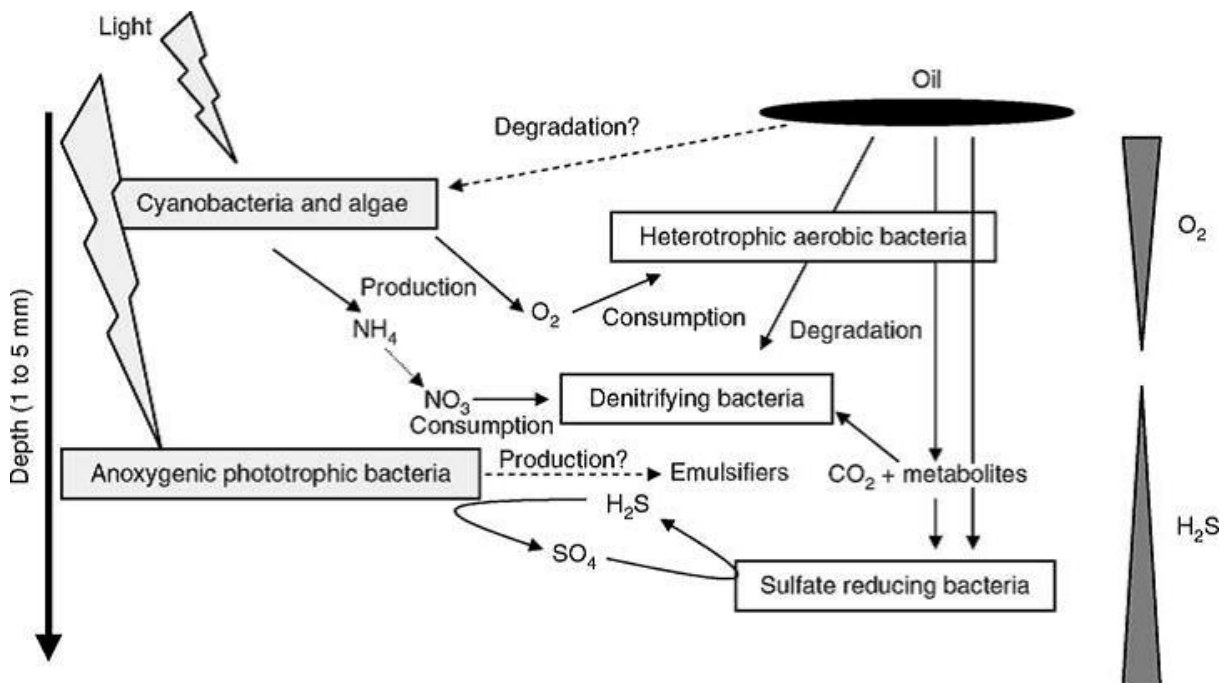


Figure I-9 : Rôle hypothétique de différents groupes fonctionnels colonisant les tapis microbiens dans la dégradation du pétrole (Duran & Goñi-Urriza, 2010).

2.2.3.2. Adaptation au pétrole des communautés de la phase anoxique

Le tapis se développe sur la nappe de pétrole, entraînant le piégeage de la nappe dans un milieu anaérobie. La dégradation des hydrocarbures dans des conditions anaérobies a été décrite mais pour seulement quelques molécules et à des taux de dégradation faible. Les tapis pourraient alors même protéger le pétrole des transformations abiotiques telles que la photo-oxydation ou l'évaporation (Garcia de Oteyza & Grimalt, 2006). Parmi les populations anaérobies du tapis, la biodégradation des hydrocarbures n'a été démontrée que pour les

bactéries dénitrifiantes et les BSR (Duran & Goñi-Urriza, 2010; Goregues *et al.*, 2004; Rabus & Widdel, 1995). Les autres groupes métaboliques anaérobies ont des rôles indirects du type synergie ou production de surfactants (Ranchou-Peyruse *et al.*, 2004). De tels écosystèmes microbiens possèdent donc les capacités de dégradation en associant plusieurs espèces bactériennes avec des capacités métaboliques complémentaires. Du fait de leur importance numérique et métabolique, les bactéries associées au cycle du soufre peuvent avoir un rôle majeur dans la dégradation des hydrocarbures au sein du tapis. L'association entre les bactéries phototrophes anoxygéniques et les BSR représente un consortium assez similaire à celui présent dans la couche supérieure avec les cyanobactéries et les hétérotrophes aérobies. Ici les phototrophes réduisent les sulfures en sulfates et produisent des surfactant utilisables par les dégradeurs (Ranchou-Peyruse *et al.*, 2004). Des structures de ce type peuvent ainsi permettre de dégrader des hydrocarbures de façon séquentielle, mais leur capacité d'épuration reste malgré tout nuancée.

2.3. Dynamique des tapis microbiens face aux métaux

2.3.1. Origine et rôle des métaux

L'altération des roches minérales et les sources anthropogéniques fournissent deux des principales entrées de métaux dans le sol. Selon Ross (1994), les sources anthropiques de contaminations métalliques peuvent être divisées en cinq principaux groupes : les mines métallifères (arsenic, cadmium, plomb et mercure), l'industrie (arsenic, cadmium, cobalt cuivre, mercure, nickel et zinc), les dépositions atmosphériques (arsenic, cadmium, chrome, cuivre, plomb, mercure et uranium), l'agriculture (arsenic, cadmium, cuivre, plomb, sélénium, uranium et zinc) et l'élimination des déchets (arsenic, cadmium, chrome, cuivre, plomb, mercure et zinc). Les métaux jouent un rôle dans les processus de vie des microorganismes. Certains métaux sont essentiels (calcium, cobalt, chrome, cuivre, fer, potassium, magnésium, manganèse, sodium, nickel et zinc) et sont utilisés dans des processus d'oxydo-réduction, pour stabiliser les molécules au travers d'interactions électrostatiques, comme composant d'enzymes et pour la régulation de la pression osmotique. D'autres métaux n'ont pas de rôle biologique et sont non essentiels (argent, aluminium, cadmium, or, plomb et mercure) et potentiellement toxiques pour les microorganismes. La toxicité des métaux non essentiels est liée à leur interaction avec des composants cellulaires au travers de liaisons covalentes ou ioniques. À des concentrations élevées, les métaux essentiels et non essentiels peuvent endommager la membrane des cellules, altérer la spécificité des enzymes, affecter la structure

des acides nucléiques et perturber les fonctions cellulaires. Le zinc, qui est un oligoélément, va par exemple, à des concentrations de l'ordre du milli-molaire sous forme ionique, se fixer à la membrane des cellules bactériennes et interférer avec la division cellulaire (Nies, 1999). Les microorganismes ont été exposés à des concentrations variables en métaux lourds depuis vraisemblablement le début de la vie (Silver & Phung, 2005). Ils ont dû maintenir une homéostasie entre la concentration en métal disponible et la physiologie microbienne (Kosolapov *et al.*, 2004). Les bactéries ont mis en place des systèmes de résistance au travers des séquestrations intra- et extra-cellulaire, des transports actifs *via* des pompes à efflux, des détoxifications enzymatiques, des réductions de sensibilité de la cible cellulaire aux ions métalliques et des exclusions *via* des membranes perméables.

2.3.2. Adaptation des tapis microbiens aux métaux

Les tapis microbiens séquestrent les métaux lourds, métalloïdes, radionucléides et oxyanions, et sont d'ailleurs utilisés en bioremédiation. Bien que ces contaminants aient des propriétés physico-chimiques complexes, les tapis microbiens font preuve d'une grande variété de mécanismes pour piéger ces éléments. Ces mécanismes entrent en jeu au niveau cellulaire, mais également au niveau de la communauté. La surface des tapis est très négativement chargée. Ces charges, distribuées le long des cyanobactéries filamenteuses, vont permettre la fixation de métaux chargés positivement tels que le Pb^{2+} , le Cd^{2+} , le Cu^{2+} ou le Cr^{3+} (Bender & Phillips, 2004). Cette chélation se produit entre les cations métalliques et les groupes anioniques sur les molécules d'EPS. La force de la liaison dépend du ratio entre la taille et la charge de l'ion et de nombreux autres facteurs tels que les compositions des EPS, la température (le gel), le pH (un pH élevé favorisera généralement la chélation) ou la salinité. Dans la zone anoxique du tapis, les espèces métalliques telles que le U^{6+} , le Cr^{6+} et le Se^{6+} sont réduites, puis sont piégées sous forme de précipités. La réduction est réalisée en présence de composés réducteurs (H_2 ou H_2S) et d'enzymes réductases extracellulaires secrétées notamment par *Rhodopseudomonas* (Mehrabi *et al.*, 2001). L'uranium est ainsi réduit en U^{4+} précipitant sous forme UO_2 (Bender *et al.*, 2000), le Cr^{6+} est réduit en Cr^{3+} et précipite en $Cr(OH)_3$ à pH légèrement élevé ; Le Se^{6+} quant à lui est réduit en Se élémentaire. Pour le manganèse, les conditions oxiques générées durant la journée permettent sa précipitation sous forme d'oxyde. Un autre mécanisme présent au sein du tapis est la synthèse de bioflocculants chargés négativement qui sont libérés dans l'eau. Ces molécules de carbohydrate se fixent aux métaux et provoquent leur précipitation. Ces bioflocculants permettent aux tapis microbiens

de fixer rapidement les métaux mais également de dégrader les composés organiques. En effet si les métaux sont rapidement fixés, les enzymes nécessaires à la dégradation des composés organiques sont préservées (Bender & Phillips, 2004). Aucune étude n'a jusque-là porté sur l'impact des métaux sur la diversité des tapis microbiens. En revanche, à un niveau plus global, il a été montré que l'impact direct de la pollution des métaux lourds sur l'écosystème microbien comprenait des altérations physiologiques de la diversité et de l'abondance des microorganismes qui affectent indirectement les cycles biogéochimiques et la productivité océanique (Jose *et al.*, 2011).

3. L'ETUDE DES TAPIS MICROBIENS EN ECOLOGIE MICROBIENNE

Les microorganismes sont en grande partie responsables des flux de matière et d'énergie dans la biosphère et sont des acteurs importants du fonctionnement et de la dynamique des écosystèmes. L'écologie microbienne qui étudie les interactions entre les microorganismes et les composants abiotiques et biotiques de leur environnement est donc d'un intérêt particulier et est appliquée dans de nombreux domaines. Une grande gamme de méthodes existe pour étudier les microorganismes, chaque méthode appréhende un aspect de l'écologie des microorganismes et permet de compléter l'image globale du fonctionnement des microorganismes dans leur environnement. Les tapis microbiens côtiers sont parmi les écosystèmes marins les plus diversifiés : cette diversité phylogénétique et fonctionnelle conséquente est attribuée à la multitude de niches environnementales potentielles et à l'importante fluctuation journalière des paramètres géochimiques clés tels que le pH, l'oxygène et les sulfures (Allen *et al.*, 2009). Cette grande diversité phylogénétique et fonctionnelle en fait donc un système d'étude particulièrement intéressant, notamment dans le cas d'environnements pollués où les tapis microbiens ont mis en place des processus d'adaptation.

3.1. Les techniques utilisées en écologie microbienne

3.1.1. Les techniques culturales

Les techniques culturales « traditionnelles » permettent de décrire les traits morphologiques, métaboliques et physiologiques des microorganismes d'un écosystème donné. Elles présentent comme avantage essentiel de pouvoir travailler sur des souches pures et ainsi d'étudier précisément un microorganisme et certaines de ses fonctions. Il est par exemple possible de caractériser *in vitro* les mécanismes biochimiques et moléculaires

impliqués dans la dégradation d'un hydrocarbure. Les propriétés métaboliques de certains sulfato-réducteurs sont tellement diverses que les études sur cultures pures sont toujours l'approche la plus prometteuse pour estimer l'activité potentielle d'une population dans un environnement (Mußmann *et al.*, 2005). Ces techniques présentent cependant certaines limites dont la principale est qu'elles ne permettent d'isoler qu'une faible fraction des divers microorganismes d'un environnement. En effet, seules 0,1 à 3% des bactéries d'une communauté seraient cultivables en condition de laboratoire (Amann *et al.*, 1995), ce qui est également le cas pour les microorganismes provenant de tapis microbiens stratifiés (Franks & Stolz, 2009). Une autre limite importante est que le comportement physiologique des bactéries est différent *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, certains microorganismes capables de dégrader un polluant présentent *in vitro* des cinétiques de dégradation différentes de celles observées dans l'environnement (Watanabe & Baker, 2000). Enfin, très peu d'informations sur les interactions entre diverses espèces bactériennes sont accessibles par ce type d'approche. Il est donc indispensable de compléter les données obtenues à partir de ces techniques culturelles de microbiologie par des études plus larges, faisant intervenir d'autres approches (ou des approches complémentaires).

3.1.2. Les techniques biogéochimiques et microscopiques

Pour caractériser le fonctionnement d'un tapis en relation à son environnement, les approches biogéochimiques s'avèrent utiles. Les micro-électrodes ou micro-sondes électrochimiques permettent de suivre les micro-variations dans des sédiments, des biofilms ou des tapis microbiens (Benthien *et al.*, 2004). Les premières utilisations en écologie microbienne concernaient les mesures des concentrations d'O₂, de S²⁻ et de pH. Depuis, un important développement technologique et méthodologique s'est amorcé et un grand nombre de solutés peuvent être mesurés à l'aide des micro-électrodes. Des bio-sondes utilisant des enzymes ou des cellules bactériennes immobilisées sont utilisées pour la mesure du CO₂ ou des NO₃⁻ et NO₂⁻ respectivement. Ces techniques sont très puissantes puisqu'elles présentent une très forte résolution spatiale et temporelle. Au sein du tapis microbien, la mesure d'O₂ à haute résolution spatiale est importante pour décrire la frontière entre les zones oxiques et anoxiques, permettant ainsi de savoir où se trouvent les micro-organismes aérobies, micro-aérophiles et anaérobies. Les micro-sondes permettent non seulement de décrire les conditions physico-chimiques des habitats mais également de mesurer les activités microbiennes en termes de taux de production et/ou de consommation. L'électrode à oxygène permettra par

exemple de mesurer des profils de respiration et de photosynthèse au sein du tapis microbien (Revsbech *et al.*, 1983).

L'activité de dénitrification peut être mesurée par une technique basée sur l'inhibition à l'acétylène. L'ajout d'acétylène permet l'inhibition de la dernière étape de la dénitrification, c'est-à-dire la réduction de l'oxyde nitreux en N_2 , et permet d'assimiler l'activité dénitrifiante à la vitesse d'accumulation de l'oxyde nitreux (Yoshinari & Knowles, 1976). Cette méthode présente cependant des limites comme la dégradation de l'acétylène par les bactéries ou encore l'interaction entre l'acétylène et les sulfures conduisant à une inhibition du blocage. D'autres méthodes basées sur le traçage isotopique sont utilisées pour suivre l'activité de dénitrification, permettant de s'affranchir de ces biais.

Les marquages isotopiques permettent de suivre la dégradation, la production ou la transformation d'un composé et d'en estimer la cinétique. Pour ce faire, des isotopes radioactifs ^{14}C , 3H ou ^{35}S ou stables, ^{15}N , ^{13}C sont utilisés. Par exemple, la sulfato-réduction très présente au sein des tapis peut être suivie par mesure de la conversion de $^{35}SO_4^{2-}$ en $H_2^{35}S$ (Fossing & Jørgensen, 1989). Les activités de dénitrification peuvent être par suivies par dosage en spectrométrie de masse du $^{28/29/30}N_2$ formé à partir du $^{15}NO_3^-$ ajouté. Cette méthode permet également de quantifier les processus d'anammox, l'oxydation anaérobie de l'ammonium avec le nitrite comme accepteur d'électron (Minjeaud *et al.*, 2008; Nielsen, 1992; Risgaard-Petersen, 2003).

La microscopie confocale a été utilisée pour comprendre la structure des biofilms. La microscopie à fluorescence ne permet qu'une vue en deux dimension des échantillons, alors que la microscopie confocale permet de réaliser des images sur plusieurs plans et de les compiler pour reconstruire les échantillons en image tridimensionnelle. Pour certains organismes tels que les cyanobactéries qui ont des caractères morphologique distincts, une détermination des organismes et une estimation de la biomasse peuvent être réalisées (Sole *et al.*, 2009).

Les approches biogéochimiques permettent de déterminer si une fonction prend place dans un environnement donné, mais ces approches ne donnent pas d'informations concernant la nature de l'organisme à l'origine de ce processus. Une manière de répondre à cette question est l'utilisation de techniques moléculaires.

3.1.3. Les techniques moléculaires

L'utilisation conjointe de techniques moléculaires avec des techniques culturales et de biogéochimie est indispensable pour lier les informations concernant la diversité et la fonction des communautés avec leur environnement. De telles méthodes permettent de caractériser les communautés bactériennes en renseignant sur leurs métabolismes mais également d'obtenir des informations sur leurs dispositions structurales.

Le gène de l'ARNr 16S s'est imposé comme une référence pour les analyses phylogénétique. Il présente de nombreux avantages ; il est présent chez tous les procaryotes, il a une faible vitesse d'évolution, une fonction conservée et une faible capacité à être transféré horizontalement (Bertrand *et al.*, 2011). Il possède de plus des domaines variables et conservés permettant d'étudier des divergences anciennes et plus récentes entre les organismes (Stackebrandt & Rainey, 1995). En dépit de ces atouts, l'étude du gène de l'ARNr 16S présente certains inconvénients : Par exemple, il a été observé jusqu'à 15 copies dans le génome de certains procaryotes (Rainey *et al.*, 1996) et les différentes copies du gènes présentes au sein d'un même génome peuvent présenter des variabilités, comme chez *Thermomonospora* où une des 6 copies présente dans le génome peut compter jusqu'à 10% de différence (Yap *et al.*, 1999). En contrepartie, le gène peut être parfois trop conservé pour pouvoir faire une distinction entre certaines espèces comme chez le complexe d'espèces *Bacillus cereus*. De plus, les amorces universelles utilisées amplifient des séquences d'un grand nombre de taxons mais l'information taxonomique qu'elles fournissent diffère en fonction de l'environnement ciblé mais également en fonction de la région du gène qui sera amplifié notamment dans le cas d'utilisation de courts fragments (Soergel *et al.*, 2012)

Les récentes avancées dans les méthodes de séquençage haut débit ont révolutionné l'écologie microbienne. Des jeux de données contenant 10^4 ou plus de lectures de la séquence du gène ciblé par échantillon sont maintenant couramment obtenus. Ces jeux de données donnent accès à un nombre de séquences beaucoup plus important que ce qui était obtenu par les libraires de clones utilisées il y a encore seulement quelques années. Les longueurs des fragments séquencés sont cependant beaucoup plus courtes que celles obtenues par la méthode de séquençage de Sanger. L'échantillonnage intensif de bactéries isolées au sein de communautés microbiennes a révélé une nouvelle diversité et a ravivé le débat sur l'importance des organismes rares et permis une meilleure compréhension des processus écologiques et biogéochimiques (Gihring *et al.*, 2012).

Malgré l'avantage de générer de grandes librairies avec la technologie du séquençage de seconde génération, de nombreuses sources de biais ont été identifiées. La diversité observée lors des analyses des données de séquençage haut débit est sensible aux biais engendrés par la préparation des échantillons, par la sélection des amorces et la zone du gène qui est ciblée (Hong *et al.*, 2009). Elle est également sujette à la formation de séquence chimérique durant l'étape de PCR. Les chimères sont des produits hybrides entre plusieurs séquences parentes qui peuvent être faussement interprétées comme de nouveaux organismes. Les librairies de séquences varient beaucoup en qualité et peuvent contenir jusqu'à plus de 45% de séquences chimériques, c'est l'un des biais majeur au sein des librairies (Haas *et al.*, 2011). De plus, le nombre de lectures par échantillons est difficile à contrôler (Gihring *et al.*, 2012). Les librairies obtenues par séquençage haut débit varient au niveau du nombre de lectures par échantillon : même au sein d'une étude, des écarts peuvent être observés. Ces écarts se répercutent sur les indices de richesse et de diversité (Chao 1, ACE, indices de Shannon). L'une des solutions pour pallier à ces biais est de faire des sous échantillonnages aléatoires des librairies, équivalents au plus faible nombre de lectures par échantillon, avant de réaliser les clusters d'OTU et ou les indices de diversité. De nombreuses études ont montré que les singletons dans les librairies de séquençage haut débit peuvent être liés à des artefacts et doivent être omis des analyses (Kunin *et al.*, 2010). Les estimateurs de richesse Chao1 et ACE dont les calculs utilisent les OTUs faiblement représentés sont très dépendant de la taille de l'échantillonnage et leurs valeurs augmentent avec la profondeur de lecture. Les indices de Shannon et Simpson bien que plus fiables pour l'utilisation en séquençage haut débit dépendent également de la taille de l'échantillonnage doivent être calculés sur la base de sous échantillonnage des librairies (Gihring *et al.*, 2012).

Les techniques de séquençage haut débit offrent une méthode puissante pour l'analyse des communautés mais la mise au point et l'interprétation de données doivent être faites avec précautions afin d'en limiter les biais.

3.2. L'étude des fonctions métaboliques

Les microorganismes catalysent une grande variété de réactions, principalement dans le but de générer de l'énergie pour leur croissance. Cela leur confère un rôle primordial dans les cycles des éléments essentiels : ceux du carbone, du soufre et de l'azote. Les marqueurs globaux, comme le gène de l'ARNr 16S, sont des gènes taxonomiques qui permettent d'étudier la structure ou la dynamique de la communauté mais ne donnent pas d'information

sur son activité. L'analyse des marqueurs fonctionnels tels que les gènes intervenant dans des fonctions métaboliques permet d'étudier les métabolismes associés aux cycles biogéochimiques et d'établir les voies métaboliques qui sont présentes au sein de la communauté. Les marqueurs fonctionnels ciblent des groupes fonctionnels particuliers, ils utilisent des gènes qui codent pour des enzymes intervenant dans des processus spécifiques qui sont conservés au sein des groupes métaboliques. Ils permettent d'analyser la diversité et l'activité des populations ayant une fonction clé dans un processus biogéochimique et fournissent de nouvelles informations sur la physiologie et l'écologie de ces groupes. L'étude des métabolismes doit se faire au travers de gènes métabolique décrits, relativement bien conservés pour pouvoir être ciblés mais également suffisamment divers pour voir une dynamique ou une variation au sein de la communauté. Ainsi il est nécessaire de sélectionner des cibles spécifiques aux fonctions pour permettre de décrire certains métabolismes dominants, tels que la fixation de CO₂ et de N₂, la photosynthèse et la sulfato-réduction au sein du tapis. Les gènes provenant d'une communauté microbienne indiquent le potentiel pour qu'une fonction particulière soit réalisée mais ces gènes ne sont pas forcément exprimés.

L'utilisation des ARN messagers permet d'examiner l'expression d'un gène pour des fonctions métaboliques liées à des processus biogéochimiques d'intérêt. Cependant il existe certaines difficultés techniques à travailler sur les ARNm : d'une part ils se dégradent plus rapidement que l'ADN ou les ARNr (Mettel *et al.*, 2010). Le temps de demi-vie des ARNm en condition de laboratoire pour *E. coli* est d'environ 5 min et de 2,4 min pour la cyanobactérie marine *Prochlorococcus* (Moran *et al.*, 2013). D'autre part, ils représentent une faible part des ARN, seulement 1 à 5% des ARN totaux (Mettel *et al.*, 2010). L'expression d'un gène peut être suivie par des approches basées sur la PCR, cependant les approches métagénomiques et métatranscriptomique par séquençage systématique tendent à éviter les étapes de PCR et les biais liés aux amorces et à l'amplification exponentielle. Elles permettent de plus d'explorer des questions impliquant plusieurs gènes simultanément. Cependant ces nouvelles techniques ont également des limites ; le séquençage du métagénome et du métatranscriptome aboutit à la génération d'un très grand nombre de courts fragments qui sont difficiles à assembler et à annoter (Markowitz *et al.*, 2011).

3.2.1. Marqueurs impliqués dans le cycle du carbone

Deux mécanismes majeurs vont participer au cycle du carbone : la fixation du carbone pour la biomasse et la respiration ou la fermentation qui permettent l'oxydation de la matière organique dans certains cas jusqu'à la minéralisation du carbone et son retour dans l'atmosphère.

3.2.1.1. Marqueurs ciblant la fixation du carbone

Dans un sédiment marin, la fixation du carbone est principalement réalisée par des cyanobactéries ou des bactéries chimiolithotrophes sulfo-oxydantes (Canfield & Des Marais, 1993). Le cycle de Calvin est le métabolisme principal décrit pour la fixation du CO₂. D'autres métabolismes tels que le cycle inverse des acides tricarboxyliques, le cycle du 3-hydroxypropionate et la voie réductrice de l'acétyl-CoA peuvent également être utilisés chez les microorganismes. La protéine la plus abondante sur terre, la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) catalyse la première étape dans le cycle de Calvin. La RuBisCO est une enzyme bifonctionnelle qui contrôle la réduction du CO₂ et l'oxygénolyse du ribulose-1,5-bisphosphate. Elle existe sous différentes formes (Figure I-10) qui diffèrent de structure, de propriétés catalytiques et de sensibilité à l'oxygène (Tabita, 1999).

La forme I, la plus distribuée, est un hexadecamère composé de 8 grandes sous-unités et 8 petites. Elle est présente chez certains organismes photo- et chimioautotrophes. Elle intervient lorsque la concentration en CO₂ diminue et que celle en O₂ augmente. Les grandes sous-unités sont codées par le gène *cbbL*. La forme I est divisée en deux groupes :

- Le groupe « green-like » qui est présent chez les plantes, les algues et les α , β et γ -*proteobacteria* ainsi que chez les cyanobactéries.
- le groupe « red-like » qui est présent chez les algues non vertes ainsi que chez les α et β -*proteobacteria*.

Une étude sur *Rhodobacter azotoformans* a montré que les deux groupes pouvaient être présentes chez un même organisme (Selesi *et al.*, 2005).

La forme II de la RuBisCO constituée exclusivement par des grandes sous-unités est codée par le gène *cbbM*. Ce gène est retrouvé chez des bactéries phototrophes pourpres, des chimioautotrophes anaérobies et aérobies facultatives ainsi que chez des dinoflagellés (Tourova *et al.*, 2006). Elle présente 25-30% de séquences d'acide aminés identiques à la forme I. On suppose que l'ancêtre commun de la RuBisCO était apparenté à la forme II car

elle fonctionne sous de faibles concentrations d'O₂, ce qui ressemble aux conditions existantes au début de l'atmosphère terrestre

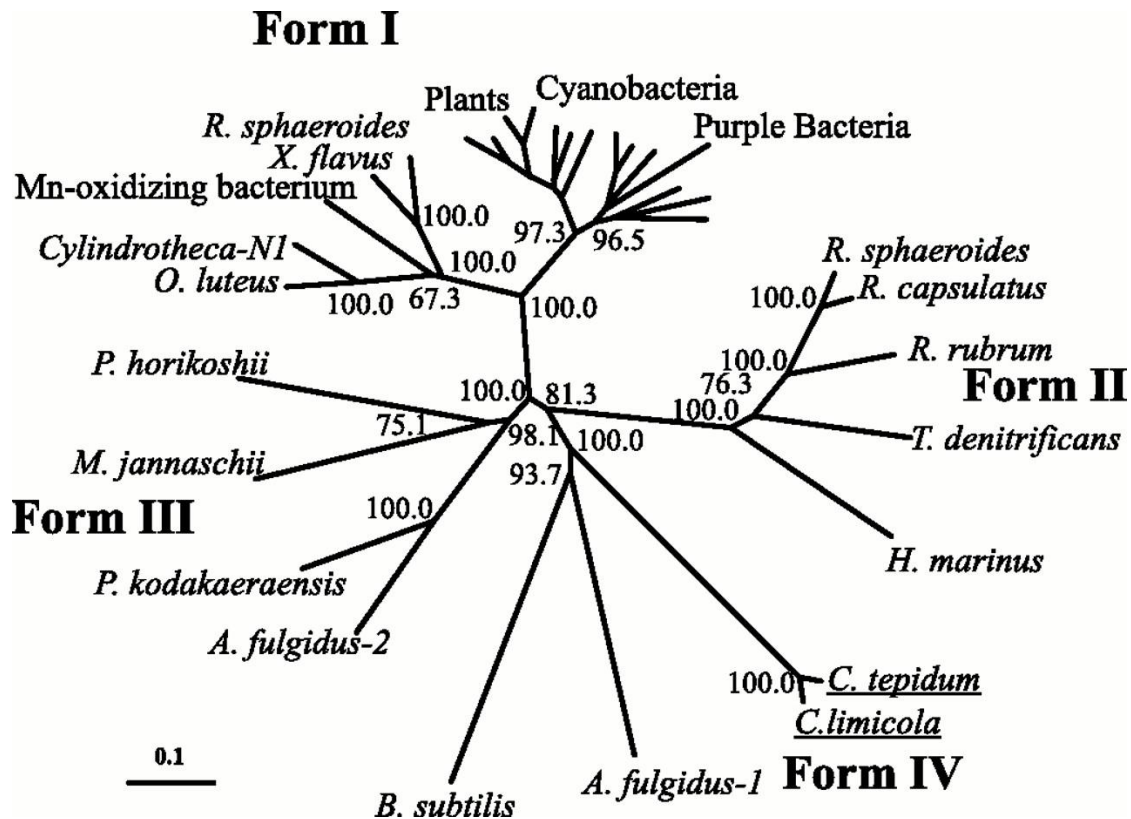


Figure I-10: Arbre phylogénétique basé sur les acides aminés de la RuBisCO (forme I à III) et de la RuBisCO-like (forme IV) provenant d'organismes procaryotes et eucaryotes d'après Hanson & Tabita, (2001)

Beaucoup de bactéries autotrophes possèdent les deux formes I et II. Deux autres formes de RuBisCO existent également : la forme III trouvée chez certaines archées, et la forme IV qui ne possède pas tous les acides aminés nécessaires à l'activité de carboxylation et d'oxygénation. Cette dernière étant désignée comme une RuBisCO-like ne participe pas au cycle de Calvin. L'analyse des gènes *cbbL* et *cbbM* de la RuBisCO permet de cibler les organismes autotrophes.

3.2.1.2. Marqueurs ciblant la dégradation de la matière organique

Le recyclage du carbone organique conduit à la formation de CO₂ et de biomasse. Il est réalisé en aérobiose par les bactéries hétérotrophes aérobies et en anaérobiose par des fermentaires, des dénitrifiantes, des BSR et des méthanogènes.

Les méthanogènes, appartenant au domaine des *Archaea*, ont une place importante dans le cycle du carbone car elles catalysent la production de méthane et de dioxyde de carbone à partir de composés méthylés et d'acétate lors de la dégradation de la matière organique dans les sols et sédiments anoxiques. Elles peuvent également réduire le CO₂ en

méthane en utilisant généralement le H₂. La méthyl-coenzyme M réductase est propre aux méthanogènes (Steinberg & Regan, 2009). Elle catalyse la dernière étape de la production de méthane biogénique et réalise la réduction d'un groupe méthyle fixé au coenzyme-M avec la libération simultanée de méthane. La méthyl-coenzyme M réductase possède trois sous-unités codées par les gènes *mcrA*, *mcrB* et *mcrG*. Ces trois gènes font partie de l'opéron *mcrBDCGA*. La sous-unité catalytique α de la méthyl-coenzyme M réductase, codée par le gène *mcrA*, possède des domaines très conservés ce qui en fait un bon candidat comme marqueur moléculaire pour des études en écologie microbienne. De plus, les arbres phylogénétiques construits à partir du gène *mcrA* pour les méthanogènes présentent des topologies comparables à celles des arbres construits à partir des gènes codant l'ARNr 16S (Figure I-11) (Luton *et al.*, 2002). Le gène *mcrA*, présent chez tous les méthanogènes, est donc un marqueur idéal pour suivre ces communautés.

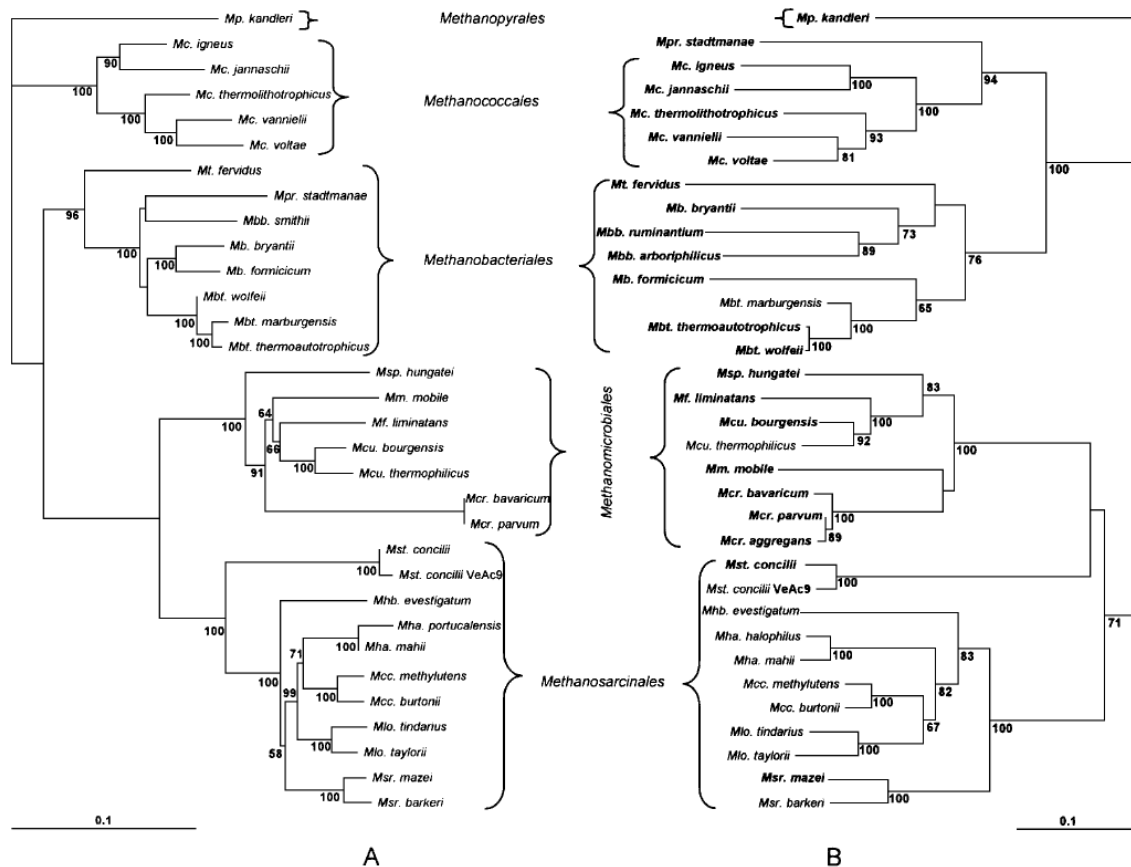


Figure I-11 : Arbres phylogénétiques montrant les relations entre les séquences de l'ARNr 16S (A) et du gène *mcrA* (B) des méthanogènes d'après Luton *et al.*, (2002)

Le marqueur cité ci-dessus ne permet de cibler que la méthanogénèse impliquée dans les dernières étapes de la dégradation de la matière organique. Avec d'autres marqueurs ciblant les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la réduction des accepteurs

d'électrons des respirations anaérobies, il est possible, indirectement de suivre la dégradation de la matière organique, parce qu'ils indiquent le métabolisme de ces groupes fonctionnels. Ces marqueurs permettent aussi de cibler les autres cycles biogéochimiques tels que ceux du soufre et de l'azote, où ils interviennent également. Ils seront d'ailleurs présentés dans les marqueurs impliqués dans les autres cycles, ceux de l'azote et du soufre.

3.2.2. Marqueurs impliqués dans le cycle du soufre

Les métabolismes associés au cycle du soufre sont très actifs dans les sédiments marins (Jørgensen, 1982) du fait de la forte concentration en SO_4^{2-} , ce qui rend les microorganismes capables de transformer les différentes formes de soufre très abondants et leur donne un rôle clé dans les transformations, pas uniquement du soufre mais également du carbone et de l'azote.

3.2.2.1. Marqueurs ciblant la réduction des composés soufrés

Sous forme oxydée, le soufre est utilisé par les BSR comme accepteur d'électrons pour réaliser la respiration sulfate (van Gemerden, 1993). La réduction dissimilatrice du sulfate est régie par trois enzymes clés : l'ATP sulfurylase, l'APS réductase et la sulfite réductase dissimilatrice codées respectivement par les gènes *sat*, *aprBA* et *dsrAB* (Figure I-12).

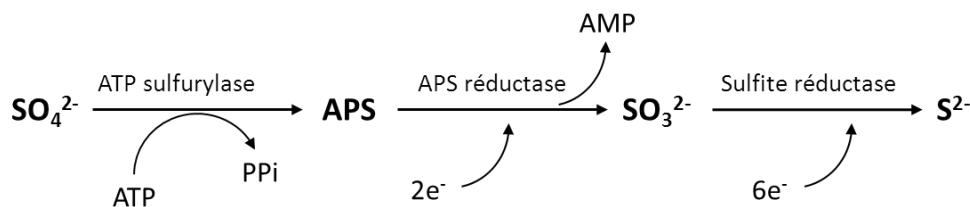


Figure I-12: Schéma simplifié de la voie dissimilatrice de la sulfato-réduction modifiée d'après Bertrand *et al.*, (2011)

L'opéron *dsrAB* a été retrouvé dans toutes les lignées de BSR connues (Wagner *et al.*, 1998) et leur est propre. La phylogénie par rapport à celle de l'ARNr16S est proche (Figure I-13) mais elle n'est cependant pas totalement conservée. Au sein de ce gène on observe fréquemment des transferts horizontaux (Klein *et al.*, 2001). Elle est codée par deux sous-unités α et β présentant des identités de séquences, indicatives de duplication de gènes (Morse *et al.*, 2000).

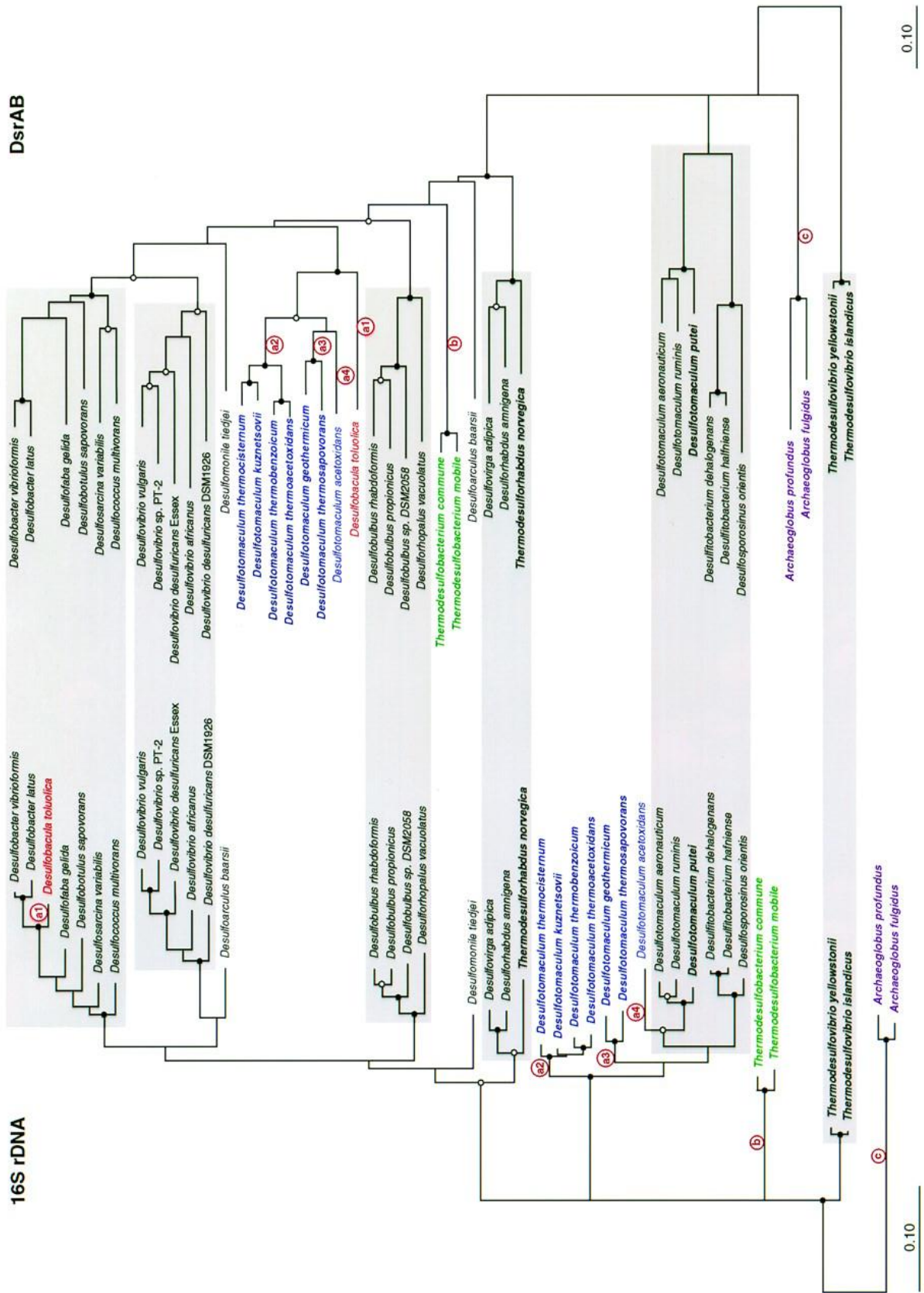


Figure I-13: Comparaison entre l'arbre phylogénétique de l'ARNr 16S et de DsrAB des procaryotes sulfato-réducteurs d'après Klein *et al.*, (2001)

3.2.2.2. Marqueurs ciblant l'oxydation des composés soufrés

Le soufre réduit est utilisé comme source d'électrons par les bactéries photosynthétiques en présence de lumière et par les chimiolithotrophes sulfo-oxydantes en présence d'oxygène. Les bactéries oxydant les sulfures utilisent plusieurs types de voies métaboliques : une impliquant un complexe multienzymatique, le complexe Sox, qui catalyse l'oxydation complète des sulfures en sulfate (la voie Sox). Cette voie a été uniquement retrouvée dans le domaine *Bacteria*. Un autre métabolisme utilise la voie réverse de la sulfato-réduction dissimilatrice (Hipp *et al.*, 1997) qui utilise également comme intermédiaire l'adenosine 5'-phosphosulfate (APS). L'APS réductase (AprAB), qui est également une enzyme clé dans la voie métabolique de la sulfato-réduction dissimilatrice réalisée par les BSR est dans ce cas impliquée dans un processus reverse. Ce gène fonctionnel permet de cibler à la fois les procaryotes sulfato-réducteurs et les procaryotes sulfo-oxydants.

D'autres microorganismes photosynthétiques sont capables d'oxyder le soufre. Un des marqueurs classiquement utilisé pour étudier ces microorganismes est le gène *pufM*, présent chez les bactéries phototrophes anoxygéniques pourpre. Le gène *pufM* code pour la sous-unité M du centre réactionnel photosynthétique de type II. Cette protéine se retrouve chez des *Alpha*, *Beta*, et *Gammaproteobacteria* et chez les *Chloroflexaceae*. Le gène *pufM* est bien conservé au sein des bactéries pourpres sulfureuses et non sulfureuses. Il est à noter que d'autres bactéries telles que *Chloroflexus* spp. appartenant aux phototrophes vertes possèdent également le gène *pufM* (Achenbach *et al.*, 2001). Bien que non impliqué directement dans la transformation du soufre, ce gène renseigne sur un groupe pouvant oxyder le soufre et est utilisé comme marqueur ciblant les photosynthétiques pourpres dans beaucoup d'études (Du *et al.*, 2006).

3.2.3. Marqueurs impliqués dans le cycle de l'azote

3.2.3.1. Marqueurs ciblant la fixation du diazote

La disponibilité en azote dans les tapis microbiens marins est l'un des principaux facteurs limitant de la production primaire. Le complexe de protéines nitrogénase catalyse la réduction du N₂ en NH₃ biologiquement utilisable. Ce complexe est formé de deux protéines : l'une est dite protéine molybdène fer ou dinitrogénase, et l'autre nommée protéine fer ou dinitrogénase reductase. Le gène *nifH* code pour la protéine-fer de ce complexe enzymatique. Généralement, l'activité nitrogénase au sein du tapis est attribuée aux cyanobactéries, cependant beaucoup d'autres groupes bactériens qui incluent les BSR, les bactéries

microaérophiles et les phototrophes anoxygéniques possèdent des espèces et des souches capables de fixer le N_2 (Steppe & Paerl, 2005). Le gène codant pour la nitrogénase réductase est très conservé au sein de ces divers organismes. De plus, ce gène présente une phylogénie congruente à celle de l'ADNr 16S (Figure I-14) (Normand & Bousquet, 1989), ce qui en fait donc un marqueur moléculaire idéal pour cibler les microorganismes fixateurs d'azote (Coelho *et al.*, 2009; Zehr *et al.*, 2003).

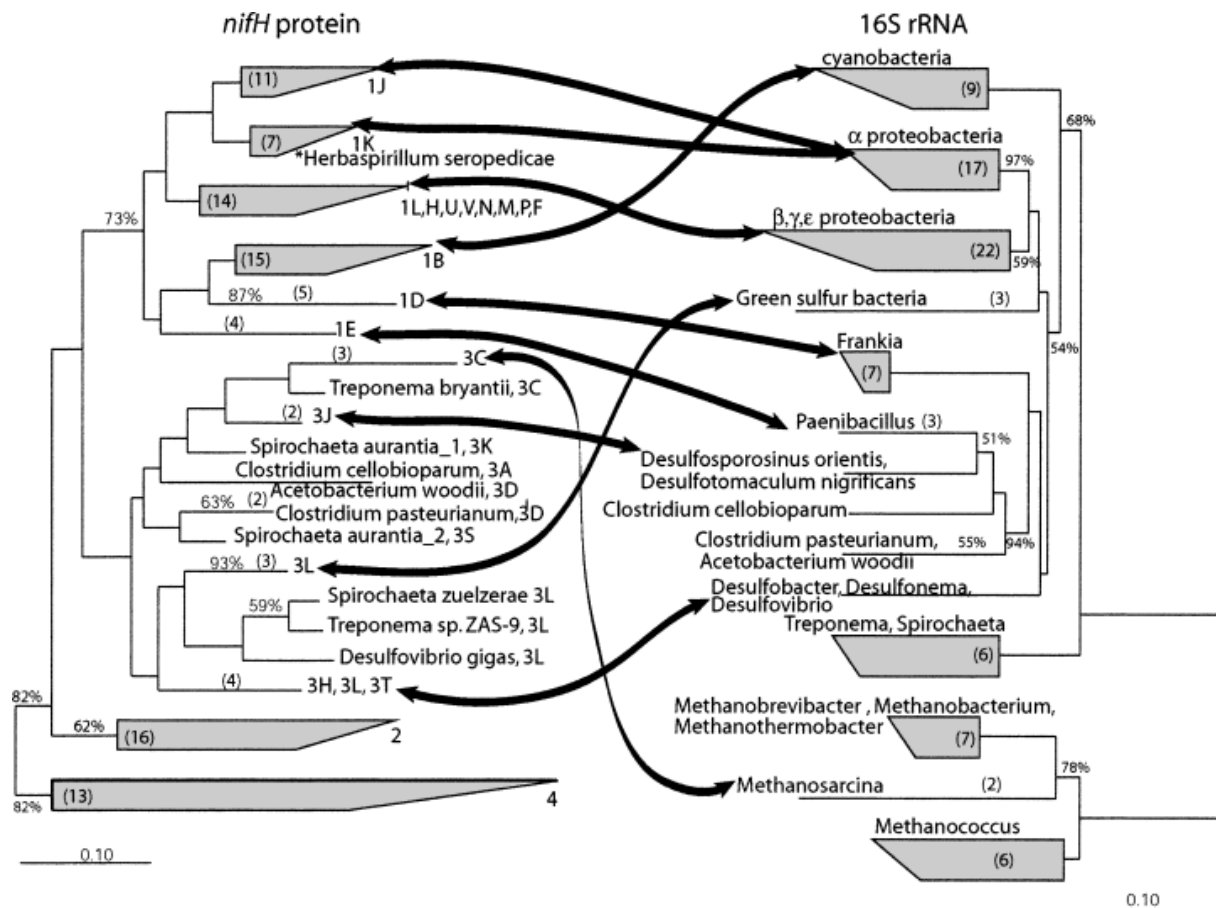


Figure I-14: Comparaison entre l'arbre phylogénétique de l'ARNr 16S et du gène *nifH* issu de souche cultivés d'après Zehr *et al.*, (2003).

3.2.3.2. Marqueurs ciblant la dénitrification

La dénitrification microbienne est un processus respiratoire constitué de quatre étapes de réactions successives lors desquelles le NO_3^- est réduit en N_2 (Figure I-15). Elle a lieu en absence d'oxygène ou sous de faibles concentrations et est réalisée par un groupe de bactéries phylogénétiquement diversifiées (Zumft, 1997). Par conséquent, les approches basées sur l'ARNr 16S sont d'un intérêt limité pour comprendre la structure et la diversité des communautés dénitrifiantes. Les gènes qui codent pour des enzymes clés intervenant dans la

réduction des nitrates ont été exploités comme marqueurs moléculaires. La réduction des NO_3^- en NO_2^- peut être suivie par l'étude des gènes *narG* ou *napA* qui codent respectivement pour la nitrate réductase fixée à la membrane et celle périplasmique. Cette étape est commune à la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (RDNA). La réduction des NO_2^- en NO est catalysée par la nitrite réductase à cuivre (codée par *nirK*) ou par le cytochrome cd1 nitrite réductase (codée par *nirS*). Jusqu'à présent, ces deux types de nitrite réductases n'ont jamais été localisés simultanément dans un même micro-organisme. Le gène *nirS* est très répandu alors que *nirK* est retrouvé chez seulement 30% des espèces de dénitrifiantes connues, comme *Aquaspirillum itersonii*, *Flavobacterium* sp. et principalement chez le genre *Pseudomonas* (Coyne *et al.*, 1989). Ces deux gènes sont utilisés comme marqueurs dans les études environnementales (Kandeler *et al.*, 2006). La réduction des oxydes nitriques en oxyde nitreux peut être suivie par le gène *norB*. Parmi les enzymes de la dénitrification, l'oxyde nitrique réductase qui catalyse cette étape fut découvert plus tardivement. Elle est par conséquent moins utilisée dans les études pour cibler la dénitrification et présente donc une base de données plus réduite. La dernière étape de la voie de dénitrification, la réduction du N_2O en N_2 , est catalysée par l'oxyde nitreux réductase, présent dans le périplasma, qui est codée par le gène *nosZ* également utilisé comme marqueur moléculaire (Kandeler *et al.*, 2006). Tous les micro-organismes dénitrifiants ne possèdent pas la totalité des gènes décrits précédemment. En effet, les microorganismes capables de ne réaliser qu'une partie des transformations sont fréquents. Pour parler de dénitrification, il demeure cependant nécessaire que le produit final de la respiration soit un composé gazeux (Knowles, 1982).

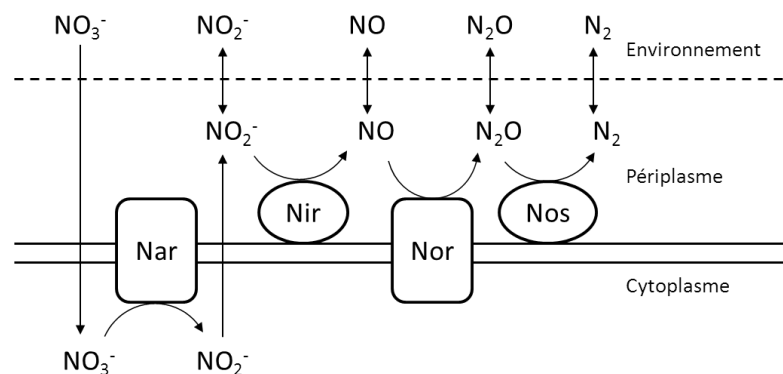


Figure I-15: Voie métabolique de la dénitrification. Les enzymes nitrate réductase (Nar), nitrite réductase (Nir), oxyde nitrique réductase (Nor) et oxyde nitreux réductase (Nos) sont codées respectivement par les gènes *nar*, *nir*, *nor* et *nos* (Kirchman, 2012).

3.2.3.3. Marqueurs ciblant la nitrification

La nitrification, est principalement réalisée par deux groupes distincts de microorganismes chimiolitho-autotrophes : les bactéries ammonia-oxydantes et archées ammonia-oxydantes (AOB et AOA) qui réalisent l'oxydation de l'ammonium en nitrite et les bactéries nitrite-oxydantes qui réalisent l'oxydation des nitrites en nitrates (Figure I-16). Les AOA et AOB sont capable d'oxyder l'ammoniac en hydroxylamine en condition anaérobies (Mulder *et al.*, 1995). C'est la première étape limitante de la nitrification. Les AOA ont été identifiées plus récemment que les AOB. Elles ont été classées dans le phylum récemment proposé des *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008) alors que les AOB ont été affiliées à deux lignées phylogénétiques, les *Beta* et *Gammaproteobacteria* (Kowalchuk & Stephen, 2001). Bien que les AOB et AOA soient affiliées à différents domaines, elles contiennent toutes les deux l'ammoniac monooxygénase (AMO). Le gène *amoA* codant pour la sous unité α de AMO, qui constitue le site actif de l'enzyme, est utilisé comme marqueur fonctionnel pour analyser la phylogénie et l'abondance des AOB et AOA dans les environnements naturels (Rotthauwe *et al.*, 1997). Plus récemment, le gène *nxrA* codant pour la nitrite oxidoréductase des bactéries nitrite oxydantes a été utilisé comme marqueur fonctionnel (Poly *et al.*, 2008) afin de cibler la deuxième étape de la nitrification : la nitratisation. Cependant la divergence de séquences de ce gène étant trop grande entre les groupes phylogénétiques, un seul couple d'amorces ne permet pas d'amplifier la totalité des séquences de ce gène (Wertz *et al.*, 2008).

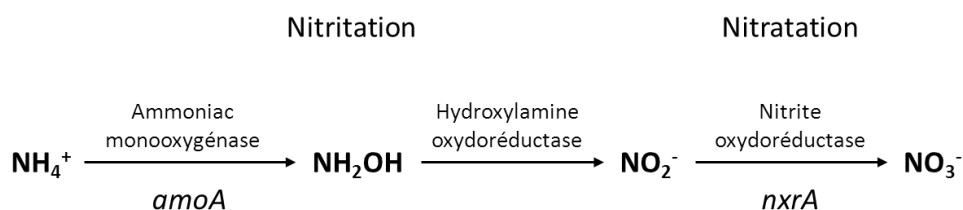


Figure I-16 : Schéma simplifié de la nitrification d'après Bertrand *et al.*, (2011)

4. OBJECTIFS

De par la proximité spatiale d'un grand nombre de souches bactérienne, les tapis microbiens démontrent une capacité fonctionnelle bien plus efficace que celle présente chez les populations de microorganismes planctoniques. Les tapis microbiens se rapprochent des tissus formés par les cellules eucaryotes par leur coopération physiologique et par leur

protection des variations environnementales du fait de la matrice d'exopolysaccharides (Costerton *et al.*, 1995). Les tapis microbiens constituent ainsi des systèmes structurés où différents procaryotes et microeucaryotes cohabitent sur la base d'interactions trophiques. Les grandes diversités bactériennes et fonctionnelles des tapis microbiens leur confèrent une importante capacité d'adaptation. L'ubiquité et la présence des tapis microbiens depuis plusieurs millions d'années témoignent de cette capacité à s'adapter dans des environnements variés et parfois hostiles. L'homme a exploité ces capacités dans des procédés d'épuration comme par exemple dans le piégeage des métaux pour la décontamination des eaux (Bender & Phillips, 2004). Les tapis microbiens se développent en présence de pétrole. Plusieurs publications ont d'ailleurs discuté du fait de leur capacité de dégradation. Même si leur rôle dans ces processus reste nuancé (de Oteyza *et al.*, 2006), l'identification et l'isolement de nombreuses espèces bactériennes hydrocarbonoclastes à partir de ces écosystèmes soulignent leur potentiel de biodégradation (Chaillan *et al.*, 2004; Goregues *et al.*, 2004). Les tapis microbiens ont fait l'objet de plusieurs études de biodiversité, également au niveau d'environnements contaminés en produits pétroliers (Abed *et al.*, 2007; Hernandez-Raquet *et al.*, 2006). Peu d'informations sont cependant disponibles concernant l'étude de l'impact d'une contamination pétrolière sur ces écosystèmes *in situ*. Dans ce contexte, le travail de thèse présenté vise à fournir de nouvelles informations concernant la structure de tapis microbiens présentant un long historique avec le pétrole. L'étude se porte sur deux tapis microbiens géographiquement proches, permettant d'obtenir des paramètres physico-chimiques comparables. La principale différence concerne le niveau de contamination pétrolière (un des tapis est issu du bassin de rétention d'eaux de ruissèlement d'une usine pétrochimique). De par la complexité taxonomique et métabolique des tapis microbiens, l'étude porte sur la communauté globale mais également au niveau des groupes fonctionnels majeurs constituant le tapis, afin d'obtenir une description des plus complète. Les groupes fonctionnels du cycle du soufre et plus particulièrement les bactéries sulfato-réductrices sont ici particulièrement ciblés de par le rôle clé de cet élément dans les milieux côtiers. L'étude vise à connaître les communautés présentes et actives mais également grâce aux nouvelles méthodes métatranscriptomiques apporte une nouvelle description quant au métabolisme dominant au sein de ces tapis microbiens.

- CHAPITRE II -
PROCEDURES EXPERIMENTALES

CHAPITRE II : PROCEDURES EXPERIMENTALES

1. MATERIEL D'ETUDE**1.1. Sites de prélèvement et échantillonnage****1.1.1. Description des sites de prélèvement**

D'une superficie de 155 km² et d'une profondeur maximale de 9,5 m, l'étang de Berre est situé dans les Bouches du Rhône à 30 km à l'ouest de Marseille (43°29'05''N; 5°11'17''E). Ce vaste plan d'eau saumâtre constitue l'une des principales lagunes de Méditerranée occidentale, reliée au golfe de Fos par le canal de Caronte. Cette zone est soumise au climat méditerranéen côtier, avec des températures douces s'étendant de 13°C à 25°C, et des précipitations annuelles moyennes de 500-600 mm. Les variations spatiales et saisonnières de la salinité des eaux de l'étang de Berre sont comprises entre 13 et 36 PSU. Les vents agissent dans l'étang comme principaux facteurs de contrôle des courants et de brassage des eaux. Les rives Ouest et Nord ont conservé leurs pinèdes et garrigues, les autres sont fortement marquées par l'agriculture (Nord-Est) et par l'industrialisation (Sud et Est) (Figure II-1).

Le développement économique autour de l'étang de Berre (premières implantation d'industries pétrochimiques dans les années 1920, centrale hydroélectrique, etc...) et les flux de polluants qui y sont associés ont provoqué de profondes modifications de cet écosystème ainsi que des dégradations sévères du milieu. L'étang de Berre reçoit des apports d'eaux douces de ses tributaires naturels : la Touloubre, la Cadière et l'Arc, mais le principal apport d'eau douce provient de la Durance par le canal usinier de la centrale hydro-électrique de Saint Chamas mise en service depuis 1966. Cet apport massif a modifié les conditions du milieu notamment par une stratification haline des eaux du lac, les eaux salées restant confinées au fond. Ainsi l'absence d'oxygène est quasi-permanente dans les eaux au-delà d'une profondeur de 7 mètres. Seules les eaux de la périphérie connaissent une oxygénation correcte ponctuée par des périodes courtes d'anoxie. Le rejet des eaux douces par la centrale est règlementé depuis 2005 mais n'a pas encore permis une réhabilitation pérenne du milieu (<http://www.etangdeberre.org>). D'une manière générale, les concentrations en polluants (plomb, cadmium, cuivre, chrome, mercure, hydrocarbures) mesurées dans les sédiments de l'étang sont élevées, conséquence du développement industriel et urbain de la région au cours des décennies passées qui a notamment entraîné l'interdiction de la pêche en 1957.

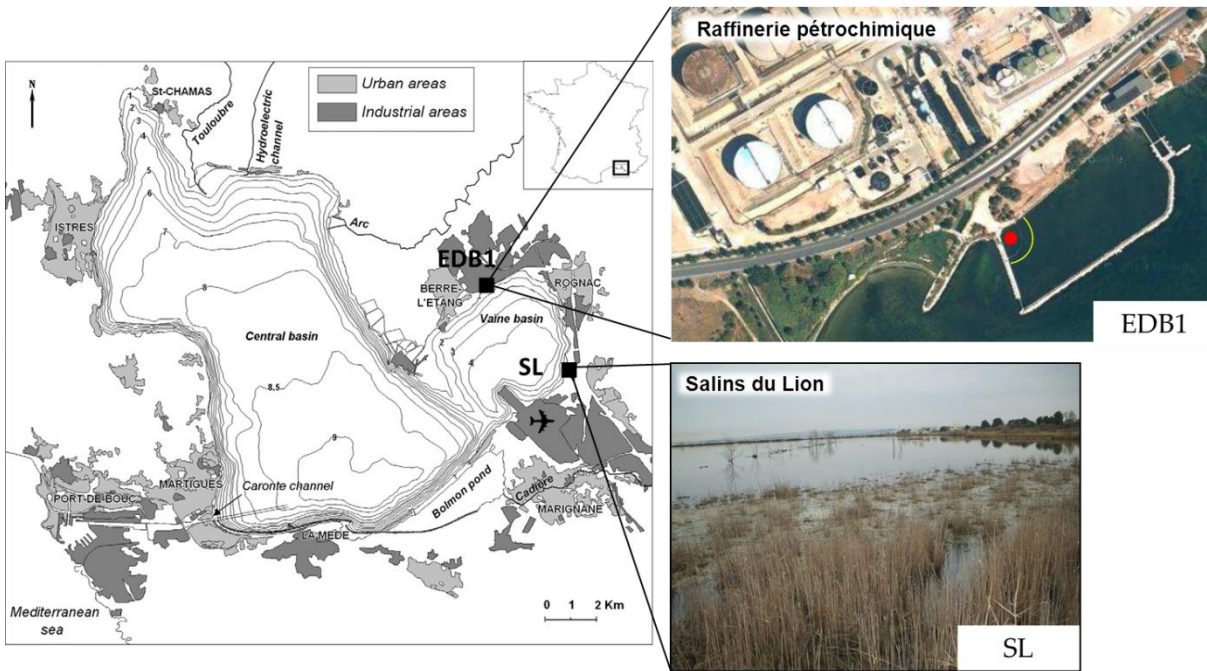


Figure II-1: Situation géographique de l'étang de Berre et des sites de prélèvement. Carte modifiée d'après Rigaud *et al.*, (2012).

Deux sites d'échantillonnage présentant des contaminations en hydrocarbures contrastées ont été sélectionnés. Le premier se situe sur la côte Est de l'étang, dans la commune de Berre l'étang. Il est localisé dans le bassin de rétention recevant les effluents d'eaux contaminées en hydrocarbures d'une usine pétrochimique installée depuis 1928 et correspond donc à l'échantillon contaminé. Les eaux contaminées passent par un premier bac de sédimentation avant de se déverser par un système de trop-plein dans le bassin de rétention. Une barrière de flottaison placée à l'entrée du bassin de rétention favorise la sédimentation des particules et des hydrocarbures. Depuis quelques années, des stations d'épuration placées en amont du bassin de rétention assainissent les effluents contaminés. Cependant, les dernières études réalisées sur ce site montrent l'importance de la contamination (Hernandez-Raquet *et al.*, 2006; Paissé *et al.*, 2008). Une pollution ponctuelle a eu lieu en 2009, suite au débordement des bassins d'orage (Beau Monvoisin & LyonDellBasell, 2009). Une diminution de l'apport en contaminant doit cependant faire suite à la fermeture de la raffinerie pétrochimique depuis début 2012. Les prélèvements ont été réalisés à l'intérieur des barrières de flottaison.

Le second site de prélèvement est également situé dans la zone Est de l'étang, sur les salins du Lions. Les salins du Lions, d'une superficie de 26 ha, sont localisés en périphérie de l'aéroport de Marignane. Localisés sur une ancienne saline il s'agit maintenant d'une réserve ornithologique. Cette zone est déclarée comme Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique

Faunistique et Floristique (ZNIEFF) de type 1 (secteurs de grand intérêt biologique ou écologique). Des plantes herbacées étaient présentes sur le site où ont été prélevés les tapis microbiens.

Des analyses d'hydrocarbures et de métaux dans les sédiments et l'eau ont été réalisées en prestations, les procédures sont détaillées dans le chapitre IV.

1.1.2. Stratégies d'échantillonnage

Quatre campagnes de prélèvement ont été réalisées en avril 2011, septembre 2011, avril 2012 et septembre 2012, elles ont été nommées respectivement C0, C1, C2 et C3. Lors de la campagne C2 deux prélèvements ont été réalisés pour les deux sites : un en journée et un autre la nuit. Pour les études de biologie moléculaire, les deux premiers centimètres de sédiments ont été récupérés et distribués dans des cryotubes pour être conservés dans de l'azote liquide jusqu'au retour au laboratoire, où ils ont été stockés à -80°C. Les prélèvements pour les analyses d'hydrocarbures et de métaux ont été réalisés sur les premiers centimètres du tapis et ont été récupérés respectivement dans des contenants en verre et polypropylène. Il a été fait de même pour l'eau des analyses physico-chimiques. Le sédiment pour les isollements et les mesures d'activité sulfato-réductrice ont été prélevés dans des flacons en polypropylène sans phase gazeuse. De l'eau a également été prélevée afin de réaliser des milieux de culture. Cette eau a été filtrée à 0,45 µm et conservée à 4°C à l'obscurité.

2. ISOLEMENT DE BSR

L'isolement des bactéries permet de décrire les traits morphologiques, génétiques, métaboliques et physiologiques des microorganismes d'un écosystème donné. Elles présentent comme avantage essentiel de pouvoir travailler sur des souches pures et ainsi d'étudier précisément un microorganisme et certaines de ses fonctions. Lors de cette étude, plusieurs méthodes culturales ont été utilisées afin d'isoler des bactéries, une méthode d'enrichissement et une méthode de culture haut débit sur microplaques. La méthode d'enrichissement a été réalisée sur milieu minimum avec comme seule source de carbone des hydrocarbures. La technique de culture haut débit a été utilisée avec un milieu riche pour BSR et sur milieu minimum avec hydrocarbures. La croissance des microorganismes avec les hydrocarbures étant lente, seule celle sur milieu riche pour BSR a donné lieu à des résultats. De ce fait seuls ces derniers seront présentés dans cette thèse.

2.1. Cultures en microplaques

2.1.1. Préparation du milieu de culture pour l'isolement de sulfato-réducteurs sur microplaque

Les milieux de culture ont été préparés avec de l'eau du site filtrée à 0,45 µm à laquelle ont été ajoutés par litre : 4g de Na₂SO₄; 0,20g de KH₂PO₄; 0,24g de NH₄Cl; 0,01% d'extrait de levure; 10 mM de tampon HEPES; 5 mM de lactate de sodium; 5 mM d'acétate de sodium; 5 mM de pyruvate de sodium; 5 mM de glycérol, 1 ml de solution de vitamines V7 (Pfennig & Trüper, 1992); 1 ml de solution d'oligo-éléments SL12 (Overmann *et al.*, 1992); 1 ml de sélénite-tungstate de sodium et 1 ml de rézasurine (Widdel & Bak, 1992) (Compositions précisées en Annexe 2). Le milieu a été stérilisé 20 min à 121°C dans des flacons type pénicilline fermés hermétiquement par un bouchon butyl maintenu par une capsule d'aluminium, puis gazés au N₂. Avant d'être utilisé, 1mM de FeSO₄.7H₂O et 200 µM de Na₂S₂O₄ ont été ajoutés au milieu et le pH du milieu a été ajusté à 7,3-7,5. L'ajout de sulfate de fer permet de visualiser la croissance des sulfato-réducteurs par précipitation du sulfure de fer lors de l'incubation.

2.1.2. Isolement des BSR

Les isolements ont été réalisés à partir du sédiment prélevé lors de la campagne d'avril 2012. Les souches ont été isolées sur microplaques de 384 puits avec un volume de 100 µl. Avant l'isolement, des séries de dilutions ont été réalisées en microplaques de 384 puits afin de déterminer la dilution pour laquelle la moitié des puits donneront des résultats positifs (Figure II-2). Pour s'assurer des conditions d'anoxie, toute la procédure a été réalisée dans une chambre anoxique (Bactron III) sous atmosphère d'azote. Les microplaques ont été scellées avec des feuilles d'aluminium et incubées 3 semaines à 18°C dans des sacs anaérobies (BD GasPakTM EZ GasGeneratingPouchSystems).

La dilution adéquate, permettant d'obtenir théoriquement une seule cellule par puits positif, a été par la suite utilisée pour les isolements en triplicata sur milieu riche en microplaques de 384 puits. Après croissance des bactéries, les puits « positifs » ont été repiqués en microplaques de 96 puits à 10% d'inoculum avant d'être re-cultivés dans des tubes venoject dans un volume final de 5 ml. Après apparition du précipité de sulfure de fer, les tubes ont été conservés à 12°C.

Lors du premier repiquage, un aliquot de 10 µl de chaque culture a été prélevé pour permettre l'identification de la souche par amplification de l'ARNr 16S par PCR et par séquençage Sanger de l'amplicon. La procédure est détaillée dans le chapitre IV.

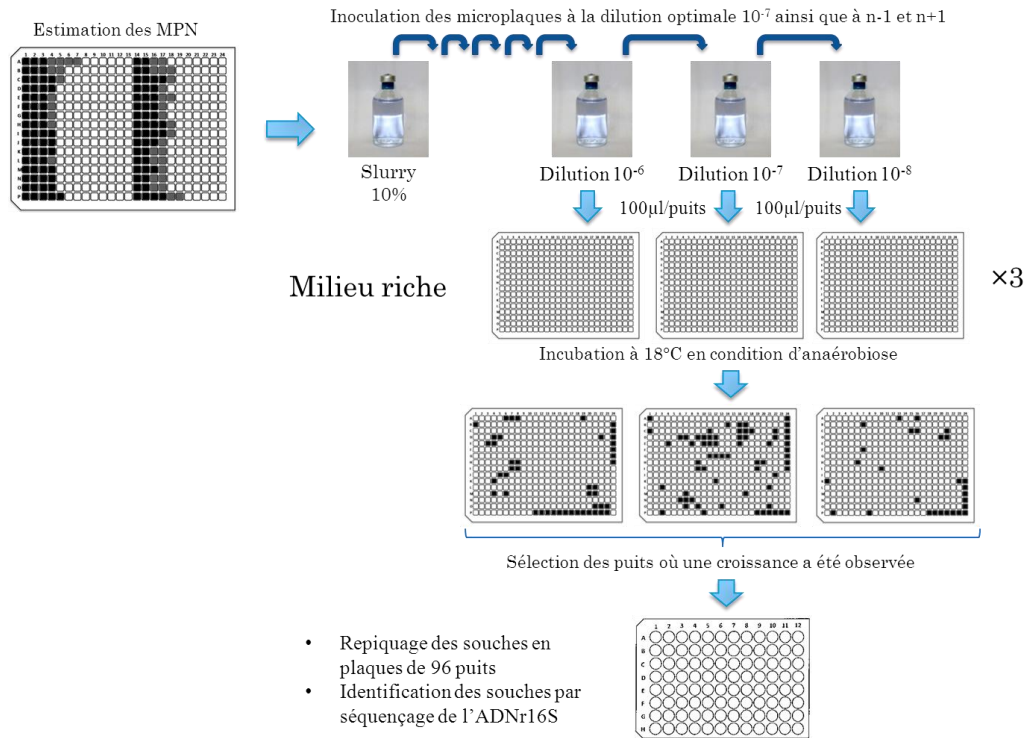


Figure II-2: Schéma synthétique de la procédure utilisée pour l'isolement de BSR en microplaques.

3. TECHNIQUES DE DOSAGES CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

3.1. Dosage des sulfures

Le dosage des sulfures a été réalisé sur l'eau des sites selon la méthode de Cline (1969). Ce dosage est basé sur la formation de bleu de méthylène engendré par l'association de deux molécules de diméthyl-p-phénylènediamine (DMPD) par un pont sulfure en présence de chlorure de fer qui fait office de catalyseur (Cline, 1969).

L'échantillon (20 µl) a été ajouté à 480 µl d'acétate de zinc à 2% (m/v) (20 g d'acétate de zinc, 1 ml d'acide acétique, q.s.p. 1 l d'eau distillée) qui permet de piéger les sulfures par formation de sulfure de zinc. Le dosage colorimétrique est réalisé en ajoutant les réactifs suivants : 200 µl de DMPD à 0,2% (m/v) (2 g de diméthyl-p-phénylènediamine sulfate ($C_{10}H_{18}N_2O_4S$), 200 ml d'acide sulfurique concentré, qsp 1 l d'eau distillée), 10 µl de chlorure de fer à 10% (m/v) puis 200 µl d'eau distillée. Après 20 minutes de réaction, l'absorbance de la solution colorée a été déterminée avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 670

nm. Le blanc a été préparé en ajoutant 20 µl d'eau distillé à la place de l'échantillon. La concentration en sulfures a été déterminée par calcul à l'aide d'un étalon, le sulfure de sodium ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$), à des concentrations connues. La limite de détection de cette méthode est de 10 µM.

3.2. Dosage des sulfates

Les sulfates ont été dosés dans l'eau des sites par la méthode turbidimétrique de Kolmert *et al.*, (2000), basée sur la précipitation du sulfate en présence d'ions baryum. Les dosages ont été réalisés en triplicat : 0,05 g de carbonate de zinc ont été ajoutés à 1,5 ml d'échantillon pour éliminer les sulfures. Après agitation et centrifugation, 0,5 ml du soluté a été mélangé avec 35 mg de $\text{BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et à 0,5 ml de réactif contenant pour 1 L : 50 g de NaCl, 100 ml glycérol, 60 ml de HCl concentré et 200 ml d'éthanol absolu. L'ensemble a été homogénéisé et l'absorbance a été mesurée à 420 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée à l'aide de solutions étalons de sulfate de sodium allant de 0,2 à 5 mM.

3.3. Mesure de l'activité sulfato-réductrice

Le taux d'activité sulfato-réductrice a été mesuré au niveau des sédiments en triplicata par la méthode de « single-step chromium reduction method » de (Fossing & Jørgensen, 1989). Elle se base sur la détermination des formes réduites du soufre produites après incubation des sédiments avec du sulfate radioactif ($^{35}\text{SO}_4^{2-}$).

5 ml de sédiments de surface ont été homogénéisés et ont été additionnés avec 1 ml de $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (37 KBeq). La concentration en sulfate contenue dans les sédiments a été déterminée par la méthode (Kolmert *et al.*, 2000) puis les sédiments ont été incubés pendant 6h à 21°C sous atmosphère de diazote. La réaction a été arrêtée par ajout d'acétate de zinc à 2%. Le sédiment a ensuite été distillé sous atmosphère d'azote avec 5 ml d'éthanol absolu, 5 ml d'eau distillée, 16 ml de solution de chrome réduit à 1M et 8 ml d'HCl à 10 M pendant 1h. Les sulfures ainsi libérés ont été piégés dans de l'acétate de zinc à 2% sous forme de ZnS. La radioactivité présente dans les pièges et dans le sédiment a ensuite été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Beckman LS6500. L'activité de sulfato-réduction a été calculée selon la formule suivante :

$$SRR \text{ (en mmoles de sulfate. cm}^{-3}\text{.h}^{-1}\text{)} = \frac{SO_4^{2-} \times a \times 1.06}{A + a \times h}$$

Avec : $[\text{SO}_4^{2-}]$ = concentration en sulfate (mmoles.cm⁻³)

a = radioactivité de la fraction contenant les sulfures (Zn^{35}S)

A = radioactivité de la fraction contenant les sulfates ($^{35}\text{SO}_4^{2-}$)

1.06 = facteur de conversion prenant en compte la discrimination isotopique liée à l'utilisation de ^{35}S par rapport au ^{32}S .

h = temps d'incubation en heures

4. TECHNIQUES MOLECULAIRES

4.1. Extractions d'acides nucléiques

4.1.1. Coextraction des acides nucléiques

Afin de pouvoir comparer les gènes (ADN) et les transcrits (ARN), les deux types d'acides nucléiques ont été co-extraits au cours d'une même procédure d'extraction en utilisant le kit RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation kit couplé avec le kit AllprepDNA/RNA mini kit de Qiagen avec la RNase-Free DNase Set (QIAGEN). Les extractions ont été réalisées en triplicatas. Le protocole du kit de RNAPowerSoil™ Total RNA Isolation kit a été suivi selon les recommandations du fournisseur jusqu'à l'étape de remise en suspension du culot des acides nucléiques (ADN/ARN mélangés). A partir de là, les acides nucléiques ont été séparés à l'aide du kit Allprep en suivant les recommandations du fournisseur. Les ADN ont été élués avec deux éluions de 100 μl tandis que les ARN ont été élués avec deux éluions de 50 μl . Toutes les manipulations ont été réalisées avec des fournitures traitées au DEPC.

Le protocole utilisé a été sélectionné après avoir comparé l'efficacité d'extraction (qualité et quantité des acides nucléiques) de différents protocoles de co-extraction sur les tapis utilisés dans cette étude. Le kit FastRNA® Pro Soil-Direct Kit, le protocole de (Hurt *et al.*, 2001) et celui de (Griffiths *et al.*, 2000) utilisés avec le kit AllprepDNA/RNA mini kit de Qiagen ont été comparés avec le protocole finalement sélectionné.

4.1.2. Purification des ARNm

Les ARN ribosomiques ont été extraits des ARN totaux à l'aide du kit Ribo-Zero™ Magnetic Kit (Bacteria) selon les recommandations du fournisseur. Un maximum de quatre réactions a été réalisé par échantillon afin d'obtenir une concentration en ARNm d'au moins 200 ng/ μl pour les analyses suivantes. Les réactions ont été ensuite purifiées ensemble par une précipitation à l'éthanol en suivant les recommandations du fournisseur.

4.1.3. Contrôle de la qualité et de la taille

4.1.3.1. Contrôle des ADN

Après extraction, la qualité et la taille des ADN extraits ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose (Eurobio). Les gels contenaient 1% (m/v) d'agarose dans un tampon TBE 1X (Acide borique 90 mM, Tris-base 90 mM, EDTA 2,5 mM pH 8.3) et du bromure d'éthidium à une concentration de 0,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$. La migration des différents échantillons a été réalisée sous une tension de 100 V pendant 20 minutes, en parallèle de la migration d'un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder, échelle de 200 à 10 000 pb, Eurogentec). Après migration des acides nucléiques, les gels d'agarose ont été placés sous lumière UV afin de visualiser par fluorescence la qualité et la quantité des ADNs génomiques extraits. La quantité d'ADN en solution a été dosée avec le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Les mesures ont été réalisées sur un appareil de PCR en temps réel Mx 3005P™ (Stratagene).

4.1.3.2. Contrôle des ARN

De la même façon que pour les ADN, les ARN ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à la différence que le matériel utilisé a été traité au DEPC.

La qualité des ARN totaux a été vérifiée à l'aide du kit Agilent RNA 6000 Nano Kit sur le Bioanalyzer d'Agilent, un RIN (RNA Integrity Number) supérieur à 7 a été obtenu pour tous les échantillons. Les ARN totaux ont été quantifiés à l'aide d'un NanoDrop ND-1000.

La qualité des ARNm a été vérifiée à l'aide du Bioanalyzer d'Agilent de la même manière que pour les ARN totaux mais avec l'aide du programme mRNA nano, l'absence ou la faible présence d'ARN ribosomique a ainsi pu être vérifiée. Une moyenne de 4,5% de contamination en ARN ribosomique a ainsi été obtenue pour nos échantillons d'ARNm d'après le Bioanalyseur. La quantification des ARNm a ensuite été réalisée à l'aide d'un NanoDrop ND-1000.

4.1.4. La rétrotranscription *in vitro* des ARNs

La rétrotranscription (RT) est une technique qui permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un brin matrice d'ARN grâce à une transcriptase inverse. La réaction de RT a été réalisée à partir d'hexamères aléatoires (Roche), de la *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* et de la *M-MLV Reverse Transcriptase* d'Invitrogen. Le protocole classique du fournisseur a été suivi. Les produits de RT ont ensuite été directement utilisés pour une réaction de PCR ou conservés à -80°C. Pour vérifier l'absence d'ADN dans

les extraits d'ARN utilisés en RT, un contrôle PCR négatif avec de l'extrait d'ARN non rétro-transcrit a été réalisé.

4.2. Réaction de polymérisation en chaîne et purification

4.2.1. Polymérisation en chaîne

Les amplifications en point final ont été réalisées sur un thermocycleur automatisé (9700 GeneAmp) selon le programme suivant : une étape de dénaturation de l'ADN 5 min à 94°C, suivie d'un cycle de dénaturation à 94°C pendant 30s, d'hybridation pendant 30s et d'élongation à 72°C pendant 30 à 40 secondes selon la taille de l'amplicon. Ce cycle est répété 30 à 35 fois et terminé par une élongation finale de 5 min. Les températures d'hybridation sont dépendantes des caractéristiques des amorces utilisées et sont décrites dans la Table II-1. La réaction de PCR est préparée dans un volume réactionnel de 50 µl contenant environ 10 ng d'ADN ou d'ADNc matriciel, 0,4µM de chacune des deux amorces utilisées (Table II-1), 0,4mM de dNTPs, 2mM de MgCl₂, 1 U de Taq polymérase (Eurobio) et son tampon réactionnel 1X final. La vérification des amplifications PCR est ensuite réalisée par une électrophorèse sur gel d'agarose 1% (conditions de migration identiques à celles décrites précédemment).

4.2.2. Purification des produits de PCR

Les produits PCR en solution ont été purifiés à l'aide du kit commercial *GFXTM DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Cette purification a pour but de séparer les fragments d'ADN amplifiés du milieu réactionnel de PCR (protéines, sels, dNTPs résiduels) ainsi que l'excès d'amorces non utilisé. La qualité et la taille des produits de PCR purifiés ont été vérifiées par électrophorèse en suivant les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus.

Table II-1 : Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés lors des PCRs. NGS ; Next-Generation Sequencing (séquençage de nouvelle génération).

	Gène	Organisme ou métabolisme ciblé	Méthode moléculaire	Amorces	Séquences (5'3')	Taille d'amplicon (pb)	Température d'hybridation	Références	
Marqueurs globaux	ARNr 16S	bacteria	NGS	104F	GGCGVACGGGTGAGTAA	426	68	Wolcott <i>et al.</i> , (2009)	
				530R	CCGCNGCNGCTGGCAC				
			Sanger	63F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	1300	58		Marchesi <i>et al.</i> , (1998)
				1387R	GGGCGGWGTGTACAAGGC				
		qPCR	bac1055YF	ATGGYTGTCTGTCAGCT	337	50	Ritalahti <i>et al.</i> , (2006)		
			bac1392R	ACGGGCGGTGTGTAC					
archaea	NGS; qPCR	arch349F	GYGCASCAGKCGMGAAW	457	58	Takai & Horikoshi, (2000)			
		arch806R	GGACTACVSGGGTATCTAAT						
Gènes impliqués dans le cycle du soufre	<i>aprA</i>	Sulfato-réduction et oxydation des sulfures	NGS; qPCR	aps1F	TGGCAGATCATGATY MAYGG	390	57	Meyer & Kuever, (2007)	
				aps4R	GCGCCAACYGGRCCRTA				
	<i>dsrB</i>	sulfato-réduction	NGS; qPCR	DSRp2060F	CAACATCGTYCAYACCCAGGG	376	54	Geets <i>et al.</i> , (2006); Wagner <i>et al.</i> , (1998)	
				DSR4R	GTGTAGCAGTTACCGCA				
	<i>pufM</i>	Photosynthèse anoxygénique	NGS; qPCR	pufMF 557	TACGSAACCTGTWCTAC	193	51	Béjà <i>et al.</i> , (2002)	
				pufMR 750	CCATSGTCCAGCGCCAGAA				
	<i>soxB</i>	Oxydation des sulfures	NGS; qPCR	soxB432F	GAYGGNGGNGAYACNTGG	261	58	Petri <i>et al.</i> , (2001)	
				soxB693B	TANGGRAANGCYTGNCCGAT				
Gènes impliqués dans le cycle de l'azote	<i>nifH</i>	Fixation de l'azote	qPCR	PolF	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	342	57	Poly <i>et al.</i> , (2001)	
				PolR	ATSGCCATCATYTCRCCGGA				
	<i>amoA</i>	Nitrification bacteria	PCR	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491	60	Rotthauwe <i>et al.</i> , (1997)	
				amoA-2R	CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC				
		Nitrification archaea	PCR	Arch-amoA-for	CTGAYTGGGCTTGACATC	256	58,5	Coolen <i>et al.</i> , (2007)	
				Arch-amoA-rev	TTCTTCTTTGTGGCCAGTA				

	Gène	Organisme ou métabolisme ciblé	Méthode moléculaire	Amorces	Séquences (5'3')	Taille d'amplicon (pb)	Température d'hybridation	Références
Gènes impliqués dans le cycle de l'azote	<i>narG</i>	Dénitrification	PCR	nar1960m2f	TAYGTSGGGCAGGARAAACTG	110	58	López-Gutiérrez <i>et al.</i> , (2004)
				narG2050m2r	CGTAGAAGAAGCTGGTGCTGT			
	<i>nirS</i>		PCR	nirSCd3aF	G TSAACG TSAAGGARACSGG	425	50	Geets <i>et al.</i> , (2006)
				nirSR3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA			
	<i>nirK</i>		PCR	583F	TCATGGTCTGCCGCGKACGG	326	65	Yan <i>et al.</i> , (2003)
				909R	GAAC TTGCCGGTKGCCAGAC			
	<i>nosZ</i>		PCR	nosZ2F	CGCRACGGCAASAAGGGTSMSSGT	267	60	Henry <i>et al.</i> , (2006)
				nosZ2R	CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA			
Gènes impliqués dans le cycle du carbone	<i>mcrA</i>	méthanogénèse	qPCR	mlas	GGTGGTGTMGDDTTCACMCARTA	470	57	Steinberg & Regan, (2008)
				mcrA-rev	CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT			
	<i>cbbL</i> "green-like"	fixation du CO2	NGS; qPCR	cbbLG1F	GGCAACGTGTTCGGSTCAA	193	57	Selesi <i>et al.</i> , (2005); Spiridonova <i>et al.</i> , (2004)
				cbbLGR	TCRTCRCYTTGGTGAARTC			
	<i>cbbL</i> "red-like"		PCR	cbbLR1F	AAGGAYGACGAGAACATC	274	56	Selesi <i>et al.</i> , (2005)
				cbbLR1intR	TGCAGSATCATGTCRTT			
	<i>cbbM</i>	NGS; qPCR	cbbM F	TTCTGGCTGGGBGGHGAYTTYATY AARAAYGACGA	328	57	Campbell & Cary, (2004)	
cbbM R			CCGTGRCCRGVCVCGRTGGTARTG					

4.3. Quantification des gènes et transcrits par amplification en temps réel

4.3.1. Principe de la quantification par PCR en temps réel

La PCR quantitative (Q-PCR ou PCR en temps réel) est une méthode qui est utilisée en écologie microbienne afin de quantifier l'abondance et l'expression de marqueurs taxonomiques et fonctionnels dans l'environnement. C'est une méthode rapide, précise et applicable aux échantillons naturels (Smith and Osborn, 2009). Elle est basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent (SYBR Green) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générée pendant la réaction de PCR. Le nombre de cycle (Ct), à partir duquel le signal de fluorescence est stable est une valeur proportionnelle au logarithme de la concentration en ADN cible. Pour calibrer la PCR, une gamme étalon d'ADN standard est utilisée. Lorsque la Q-PCR est couplée au préalable à une réaction de transcription inverse, elle peut être utilisée pour quantifier l'expression des gènes (RT-PCR quantitative).

4.3.2. Génération d'un standard externe

4.3.2.1. Standard externe pour la quantification des ADN

Le standard consiste en une solution titrée d'ADN ou d'ADNc amplifiés par PCR selon les conditions décrites précédemment avec 1 μ L d'ADN et les mêmes amorces que celles utilisées pour quantifier le fragment. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit commercial *illustra™ GFX™ PCR DNA and gel band purification kit* (GE healthcare) comme décrit précédemment. Les produits ont ensuite été clonés dans le vecteur pCR®-2.1-TOPO® avec le kit de clonage *TOPO TA Cloning®* (Invitrogen). Le produit de PCR est inséré dans le vecteur de clonage qui est activé par une topoisomérase I permettant la ligation du produit de PCR. Les bactéries compétentes sont ensuite transformées avec le produit de ligation. Les clones ayant intégré le plasmide recombinant sont sélectionnés sur milieu solide Luria-Bertani LB Broth (Tryptone, 10 g.L⁻¹ ; extrait de levure, 5 g.L⁻¹ ; NaCl, 5 g.L⁻¹), ampicilline, 100 μ g.mL⁻¹ ; IPTG, 40 μ g.mL⁻¹ et X-gal, 40 μ g.mL⁻¹ selon le test blanc/bleu de la β -galactosidase. Enfin, l'insert des clones recombinants pris au hasard est amplifié en réalisant la réaction de PCR directement sur les cellules bactériennes pour chaque clone avec les amorces M13F et M13R situées sur le plasmide et entourant l'insert d'ADN. Les étapes de PCR utilisées sont les suivantes : 15 min à 94°C, 35 cycles de 3 étapes (45 sec à 94°C, 45 sec à 54°C, 1 min à 72°C) puis 10 min à 72°C. La taille et la quantité d'insert amplifié ont été contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% puis les inserts ont été vérifiés par séquençage Sanger par GATC biotech (<http://www.gatc-biotech.com/fr/index.html>). Enfin, un

clone recombinant a été ensemencé dans du LB liquide avec de l'ampicilline à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Les plasmides recombinants ont ensuite été extraits à l'aide du kit *QIAprep Miniprep* (Qiagen) à partir de 4,5 ml de culture. Les plasmides ont été linéarisés avec 3 U d'enzyme *HindIII* pour 100 ng d'ADN plasmidique pendant 3h à 37°C. Les plasmides linéarisés ont été vérifiés par électrophorèse. Ils ont ensuite été purifiés au phénol : chloroforme : alcool isomylique (PCI) (25:24:1, v:v:v) et au chloroforme isoamyl. L'ADN a été précipité à -20°C toute une nuit dans deux volumes d'éthanol 100% et 1/10 d'isopropanol. Une étape de lavage a été réalisée avec de l'éthanol 70% puis le culot a été resuspendu dans 20 μL d'eau stérile. Après linéarisation du plasmide, la quantité d'ADN plasmidique en solution a été dosée avec le kit *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits* (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Les mesures ont été réalisées sur un appareil de PCR en temps réel Mx 3005P™ (Stratagene).

Le nombre de copies du gène ciblé est ensuite déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Nombre de copies. } \mu\text{l}^{-1} = \frac{6,022 * 10^{23} * \text{concentration ADN (g. } \mu\text{l}^{-1})}{\text{Taille du plasmide pb} * MM}$$

Avec

$$6,022 \times 10^{23} = \text{nombre d'Avogadro en mol}^{-1}$$

MM = la masse molaire (en considérant que le poids moyen d'une paire de base est de 650 Daltons)

Ainsi, la gamme standard peut être générée par dilution de l'ADN plasmidique.

4.3.2.2. Standard externe pour la quantification des ADNc

Pour la quantification d'ADNc, il est nécessaire de confectionner une gamme standard d'ADNc. De ce fait, une transcription *in vitro* est réalisée sur l'ADN plasmidique avec le kit *MEGA script® T7 Kit* (Ambion) selon les recommandations du fournisseur. L'ARN obtenu est ensuite quantifié avec le kit *Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kits* (Invitrogen), et le nombre de copies du gène ciblé est déterminé à l'aide de la même formule énoncée plus haut excepté que $MM = 340$ Daltons. Enfin, une transcription inverse est réalisée à partir de l'ARN synthétisé (dont le nombre de copies est connu), et des dilutions des produits de RT (ADNc) sont réalisées pour la confection de la gamme standard.

4.3.3. Amplification en temps réel

Les quantifications ont été effectuées en duplicata sur un appareil de PCR en temps réel Mx3005P™ (Stratagene) dans un volume final de 20 µL contenant 1µL d'ADN matriciel ou d'ADNc, 0,4 µM de chaque amorce (Table II-1) et le mélange enzymatique de *DyNAmo™ Color Flash SYBR® Green qPCR Kit* (Finnzymes) à une concentration finale de 1X. Les amplifications ont été précédées d'une étape de dénaturation initiale (10min à 95°C), puis de 40 cycles selon 3 étapes : dénaturation (1 min, 95°C), hybridation des amorces à la température d'hybridation (Table II-1, 30 sec) et élongation (40 sec, 72°C). Le SYBR Green est un agent intercalant de l'ADN double brin qui, excité à 492 nm, émet de la fluorescence à 515 nm mesurée par l'appareil à la fin de l'étape d'hybridation. Une courbe de fusion des produits de PCR obtenus a été réalisée à la fin de chaque amplification. Pour cela, une rampe de température de 55°C à 95°C est effectuée durant laquelle la fluorescence est mesurée tout le long.

4.4. Analyses moléculaire de la diversité

4.4.1. Analyse de la diversité par séquençage de Sanger

L'identification des souches de sulfato-réducteurs a été réalisée par séquençage Sanger de l'ARNr 16S. Les fragments d'ADN obtenus après amplification de l'ARNr 16S avec les amorces 63F et 1387R (Marchesi *et al.*, 1998), comme décrit précédemment avec une durée d'hybridation de 1 minute, ont été séquencés dans un sens avec l'amorce 63F par GATC Biotech (Konstanz, Germany).

4.4.2. Analyse de la diversité par séquençage haut débit

4.4.2.1. Principe du séquençage illumina

La technique de séquençage illumina permet le séquençage massif et parallèle de petits fragments d'ADN. Cette méthode domine le marché, elle peut produire jusqu'à 15 Gb de données et près de 40 millions de séquences par analyse.

Les molécules d'ADN simple brin sont séparées et immobilisées sur une lame de verre par hybridation entre une amorce fixée sur la lame et l'adaptateur fixé sur la molécule d'ADN (Figure II-3). Les fragments immobilisés sont ensuite amplifiés par PCR par pont ou « bridge PCR ». L'extrémité opposée du brin nouvellement synthétisé est hybridé à l'amorce anti sens qui est présente sur la lame de verre. Plusieurs cycles d'extension des amorces et de dénaturation au formamide permettent de générer un cluster de quelques milliers de copies de la même séquence. Une amorce de séquençage est ensuite hybridée aux fragments

immobilisés pour permettre l'incorporation de nucléotide contenant un terminateur de chaîne réversible marqué par un fluorochrome différent selon le nucléotide. Les fluorochromes sont ensuite excités par des lasers permettant l'émission d'un signal lumineux spécifique à chaque nucléotide. La fluorescence est détectée sur toute la lame afin d'associer les nucléotides incorporés aux différentes positions spatiales permettant de reconstruire la séquence de chaque fragments. Les terminateurs de chaîne sont ensuite clivés afin de permettre un nouveau cycle d'ajout de nucléotides. La succession de ces étapes permet d'accéder à la séquence du fragment d'ADN de chaque cluster.

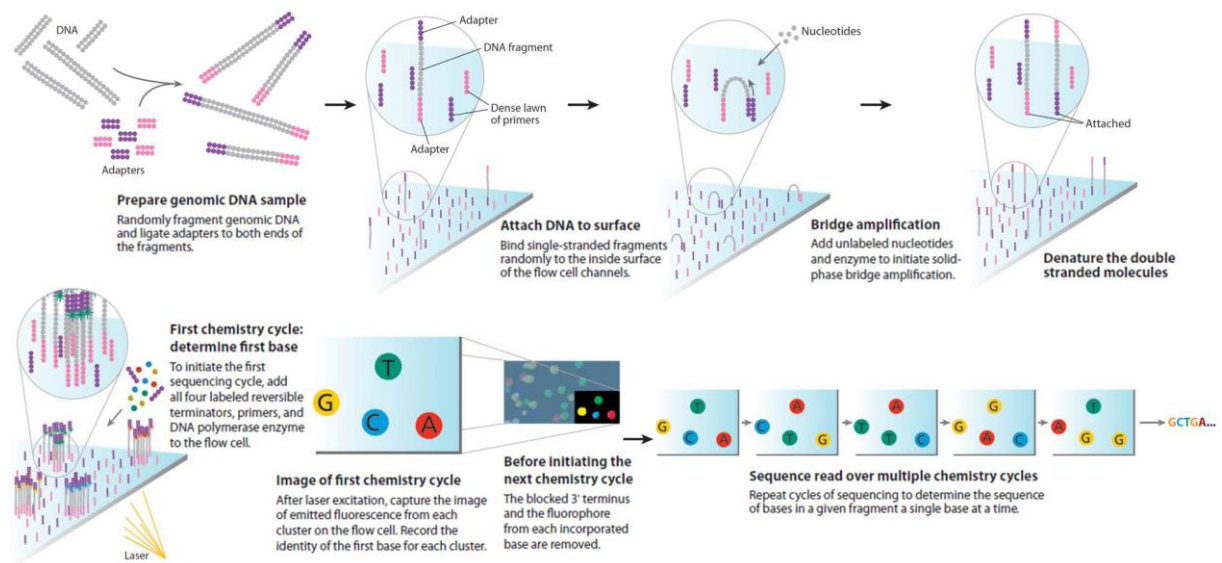


Figure II-3 : Principales étapes de séquençage par la technologie illumina (modifié d'après (Mardis, 2008))

4.4.2.2. Séquençage des amplicons

Les amplicons ont été séquencés en utilisant la technologie MiSeq 300 ; 250 et 150-paired-end technology (Illumina) selon la taille des amplicons. La technologie MiSeq produit des séquences entières de qualités élevées par concaténation des lectures dans les deux sens de l'amplicons. La première PCR a été réalisée avec les amorces, décrites dans le Table II-1, contenant les adaptateurs CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT et GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT pour l'amorce sens et anti-sens respectivement. Les conditions de PCR étaient les mêmes que celles décrites précédemment. Les multiplexes ont été réalisés en utilisant des index de séquences maison qui ont été ajoutés aux amorces anti-sens lors de la seconde PCR avec 12 cycles en utilisant les amorces sens (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACTCTTTCCCTACACGAC) et anti-sens

(CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT). Les produit de PCR ont été purifiés et chargés dans la cartouche illumina MiSeq selon les instructions du fabricant. Après séquençage, la qualité a été vérifiée en utilisant le logiciel PhiX : chaque séquence a été affiliée à son échantillon en utilisant l'index qui avait été intégré. Les analyses bioinformatiques des séquences sont décrites dans les parties 5.2 et 5.3.

4.4.2.3. Séquençage systématique du métagénome et du métatranscriptome

Les séquençages du métagénome et du métatranscriptomes ont été réalisées à la plateforme génomique de Toulouse (Genotoul). Brièvement, les librairies d'ARN pour le séquençage ont été préparées selon le protocole du fournisseur illumina sur un Tecan EVO200 liquid handler en utilisant le kit IlluminaTruSeq Stranded mRNA sample prep pour analyser les ARNm après enrichissement. Les ARNm ont été fragmentés pour générer des ADNc double brin. 10 cycles de PCR ont été réalisés pour amplifier les librairies qui ont ensuite été quantifiées par qPCR en utilisant le kit KAPA Library Quantification kit. Le séquençage des ARN et des ADN ont été réalisés sur l'instrument Illumina HiSeq2500 en utilisant des paires de reads de 2x100 pb avec le kit Illumina TruSeq SBS sequencing kits v3. Un minimum d'environ 14 millions de séquences a été obtenu par échantillon pour les échantillons d'ARNm et de 36 millions pour les échantillons d'ADN.

5. ANALYSES INFORMATIQUES

5.1. Traitement des séquences de l'ARNr 16S obtenues par séquençage Sanger

Les séquences nucléotidiques obtenues par séquençage Sanger ont été nettoyées à l'aide du logiciel Sequencher 4.1.4 (Gene Codes®). Elles ont ensuite été regroupées en OTUs à l'aide du logiciel Mothur (Schloss *et al.*, 2009) ; une recherche de chimère a été effectuée sur les séquences, puis la distance entre les séquences a été calculée pour regrouper ensuite en OTUs les séquences partageant au moins 97% d'identité.

Les séquences de référence des OTUs ont ensuite été alignées à l'aide du logiciel ClustalW 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) avec celles de référence présentes dans la banque de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Elles ont ensuite été ajustées à la taille de la séquence la plus courte. Un arbre phylogénétique a été réalisé avec l'aide du logiciel Mega 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) à partir des séquences alignées. La méthode du neighbor joining a été utilisée avec un bootstrap de 1000 afin de vérifier la robustesse de l'arbre.

5.2. Traitement des séquences de l'ARNr 16S obtenues par séquençage haut débit

Les séquences brutes ont été concaténées avec Flash (Magoč & Salzberg, 2011) pour ne retenir que celles complètes. Les séquences ont ensuite été traitées avec l'algorithme USEARCH version v7.0.1090_i86linux32 (Edgar, 2013) comme suit :

- (1) Les séquences ont été filtrées avec une taille minimale de 380 pb et une qualité minimum de 10 en utilisant la commande « `-fastq_filter` » (Table II-2).
- (2) Les séquences identiques ont ensuite été regroupées avec la commande « `-derep_fulllength` »,
- (3) Puis alignées sur le modèle de l'ARNr 16S en utilisant SSU-Align (Nawrocki, 2009). Les séquences ont ensuite été filtrées selon leurs coordonnées d'alignement
- (4) Les séquences ont ensuite été regroupées (pre-clustered) en autorisant jusqu'à 1% d'erreur à l'aide de la commande `-cluster_smallmem` en spécifiant une identité de 0,99. Les clusters avec moins de deux séquences identiques ont été éliminés
- (5) Les séquences chimériques ont été supprimées à l'aide de la commande `-uchime_r` et d'une base de donnée « Gold standard » (Edgar *et al.*, 2011)
- (6) Les séquences ont été clustérisées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) avec une distance maximum de 2% avec la commande « `-cluster_otu` »
- (7) Les clusters obtenus ont été groupés avec les séquences consensus avec la commande « `-cluster_smallmem` », un « `-id` » à 0.97 (3% de distance) et l'option « `-centroids` »
- (8) L'abondance des OTUs a été calculée en alignant chaque séquence aux OTUs finaux en utilisant l'alignement global de routine de USEARCH (`-usearch_global`).
- (9) L'affiliation taxonomique a été réalisée à l'aide de la base de donnée Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006) en utilisant le script « `assign_taxonomy.py` » de QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) qui utilise la classification naïve bayésienne (option `-m` `mothur`)

Afin de normaliser les données des échantillons, les réplicatas ont été regroupés et 100 échantillonnages aléatoires correspondant au nombre minimum de séquences par réplicatas ont été réalisés.

Table II-2 : Données obtenues au travers du pipeline utilisé pour traiter les séquences de l'ARNr 16S des bactéries et archées

Organisme cible	Nombre de séquences brutes	Nombre de séquences après filtration	Nombre total d'OTU
<i>Bacteria</i>	4142631	3224487	24191
<i>Archaea</i>	2613982	2019658	8796

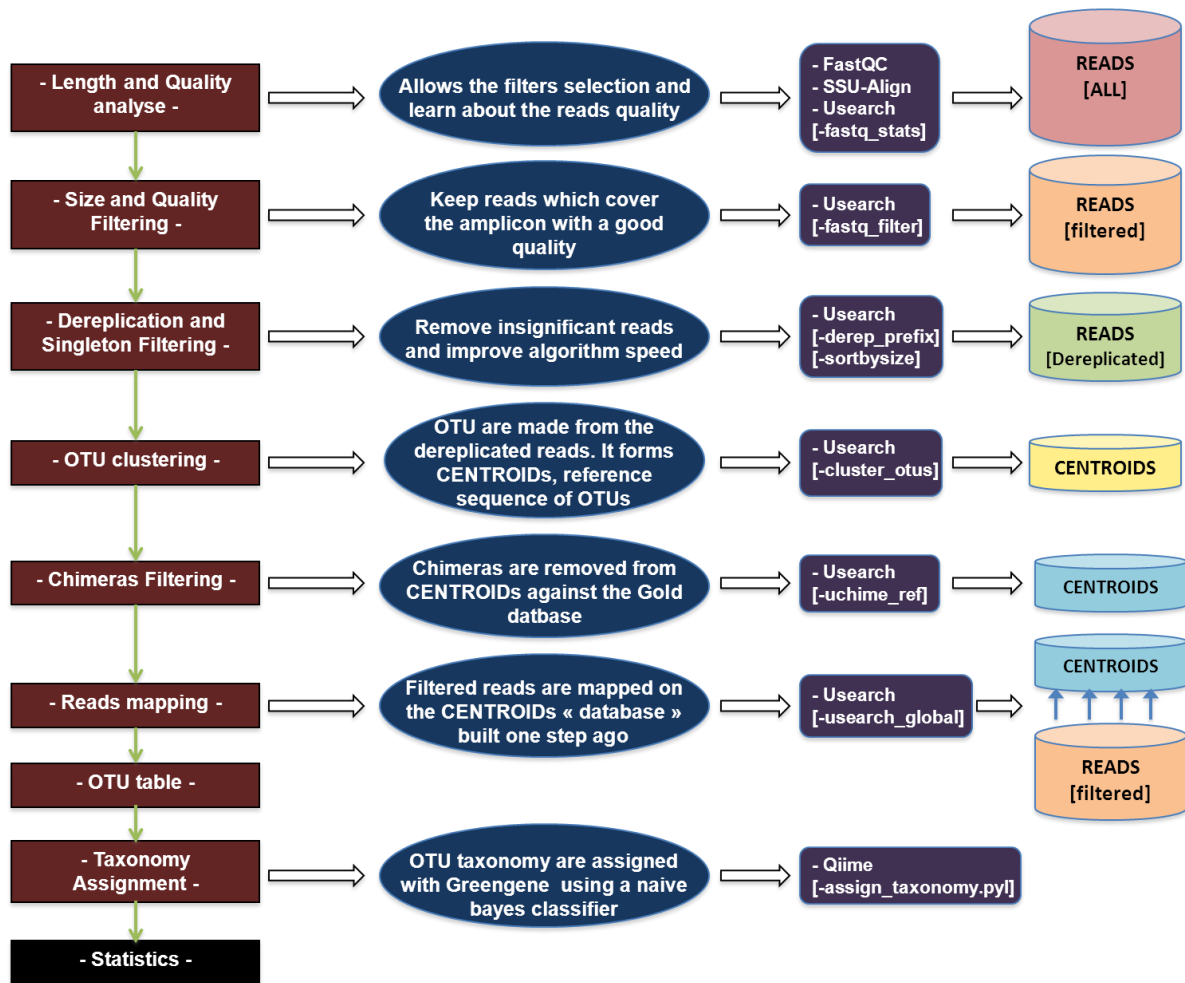


Figure II-4 : Description des étapes utilisées pour le traitement des séquences de l'ARNr16S bactérien et archéen

5.3. Traitement des séquences des gènes fonctionnels obtenues par séquençage haut débit

Le pipeline « genefunc » sur ng6 (Mariette *et al.*, 2012) a été conçu pour traiter les données comme suit :

- (1) Flash (Magoč & Salzberg, 2011) a été utilisé pour concaténer les séquences, permettant de réduire le nombre de N à la fin des séquences. L'analyse a été réalisée avec un overlap minimum et un overlap maximum décrits dans le Table II-3 et avec un ratio de mésappariements maximum de 10%.
- (2) Les séquences ont été filtrées selon leur taille, le nombre de bases ambiguës (aucune N autorisée) et la présence de chimères. Cette analyse a été réalisée avec l'algorithme « uchime_denovo » de usearch (Edgar *et al.*, 2011).
- (3) Les séquences ont été traduites en utilisant Framebot (Wang *et al.*, 2013). Une base de données correspondant à la protéine traitée a été construite pour sélectionner le cadre de lecture. Les séquences peptidiques contenant un codon stop ont été éliminées.
- (4) Les séquences peptidiques obtenues ont été clustérisées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) avec CD-HIT (Li & Godzik, 2006) basé sur un pourcentage d'identité propre au gène traité (Table II-3). Les réplicatas ont été vérifiés en réalisant un cluster hiérarchique et en comparant la proportion des clusters de chaque échantillon. Les OTUs présents dans un seul réplicata ont été éliminés de même que les clusters ne contenant qu'une séquence.
- (5) Tous les clusters ont ensuite été groupés par réplicata et 100 échantillonnages aléatoires correspondant au nombre minimum de séquences par réplicata ont été réalisés (Table II-3).
- (6) L'affiliation taxonomique des clusters a été réalisée pour chaque OTU en utilisant blastp (Camacho *et al.*, 2009) permettant une e-value maximum $1.10e-5$. Les bases de données de référence ont été construites en utilisant les séquences peptidiques de la base de données nr de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), en sélectionnant uniquement les séquences de bactéries isolées. Les séquences de référence des OTUs et les séquences de la base de données ont été alignées par ClustalW (Larkin *et al.*, 2007).
- (7) Des arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant l'algorithme du neighbour joining sur le logiciel Mega 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) et l'affiliation taxonomique des OTUs a été réalisée à partir de l'arbre.

Table II-3: Paramètres utilisés pour traiter les gènes fonctionnels avec le pipeline genefunc et données obtenues

Gène	Taille de la base de données	Longueur des reads (pb)	Overlap minimum (pb)	Overlap maximum (pb)	Nombre de séquences brutes	Nombre de séquences après filtration	Seuil d'identité (%)	Nombre de séquences sous-échantillonnées	Nombre total d'OTU
<i>dsrB</i>	250	250	90	150	1894851	1643993	95	10000	8739
<i>aprA</i>	161	300	180	240	2102704	1886496	91	15000	3329
<i>soxB</i>	96	250	190	240	817897	784437	94	7500	2947
<i>pufM</i>	96	150	80	130	1019158	970587	93	16000	3591
<i>cbbL "GL"</i>	154	250	230	280	836815	814166	100	10000	13061
<i>cbbM</i>	91	300	250	300	1457347	1376661	100	20000	28521

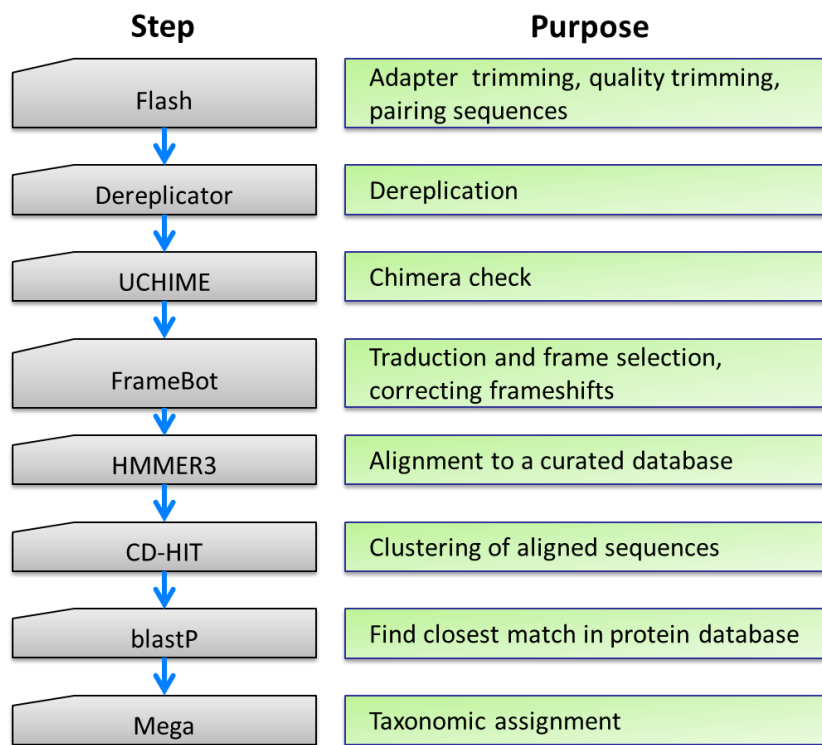


Figure II-5: Description des étapes du pipeline utilisé pour le traitement des séquences des gènes fonctionnels

5.4. Traitement des séquences issues du séquençage systématique du métagénome et du métatranscriptome.

Afin de retirer les adaptateurs et de vérifier la qualité des séquences, Trim Galore ! (Wu *et al.*, 2011) a été utilisé : il utilise l'outil cutadapt (Martin, 2011) pour réaliser le découpage des séquences et l'outil FastQC (Andrews, 2010) pour le contrôle de la qualité des séquences. Les adaptateurs ont été retirés des séquences d'après les index des adaptateurs

Illumina TruSeq. Les séquences ont ensuite été filtrées selon leur qualité avec un seuil de 30 d'après l'échelle de Phred. Si, malgré le filtre, il persistait des séquences de moins de 50 pb, elles ont été retirées pour le reste des analyses.

Les quantités de données obtenues étaient trop importantes pour pour utiliser des annotations de métagénome en ligne du type MG/RAST (Meyer *et al.*, 2008) ou IMG/M (Markowitz *et al.*, 2011) nous avons choisi d'utiliser la base de données de gènes Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) de 2014 (Kanehisa *et al.*, 2014; Kanehisa & Goto, 2000). Cette base de données intègre des informations génomiques, chimiques et fonctionnelles et permet relier les voies métaboliques aux génomes. C'est une base de données qui est curée est mise à jour régulièrement.

Last aligner v392 (Frith *et al.*, 2010) a été utilisé pour aligner les séquences filtrées (ARNm et ADN) à la base de données. La méthode du « single-directional best hit » a été utilisée pour annoter chaque séquence (Moriya *et al.*, 2007).

L'aligneur Last est recommandé pour l'analyse des séquences d'un organisme ne possédant pas de génome de référence disponible. Cette méthode d'alignement a été au préalable comparée à d'autres méthodes ; Blastx ne pouvant pas fonctionner sur la quantité de données que nous avons (2,6 milliards de séquences)(Table II-4 et Annexe 1), les aligneurs Last et Pauda ont été comparés : Last permet d'aligner en moyenne 34% des séquences des échantillons alors que Pauda ne permet, dans le meilleur des cas, l'alignement de 25,5% des séquences à la base de donnée KEGG, Last permettant par ailleurs d'avoir des pourcentages d'identité plus élevés que ceux donnés par Pauda (Figure II-6).

Table II-4 : Temps de calcul des aligneurs sur la base de données KEGG à partir d'un échantillon de 100 000 séquences tirées aléatoirement ou avec un réplicata de l'échantillon d'ARNm de SL de la campagne C2.

Données	Blastx	LAST	PAUDA
100 000 séquences aléatoires	2199min et 58,740s	1min et 19,390s	12min et 51,020s
ARNm-SL-C2-a 45210625 séquences	Infaisable	513min et 55,863s	2339min et 20,823s

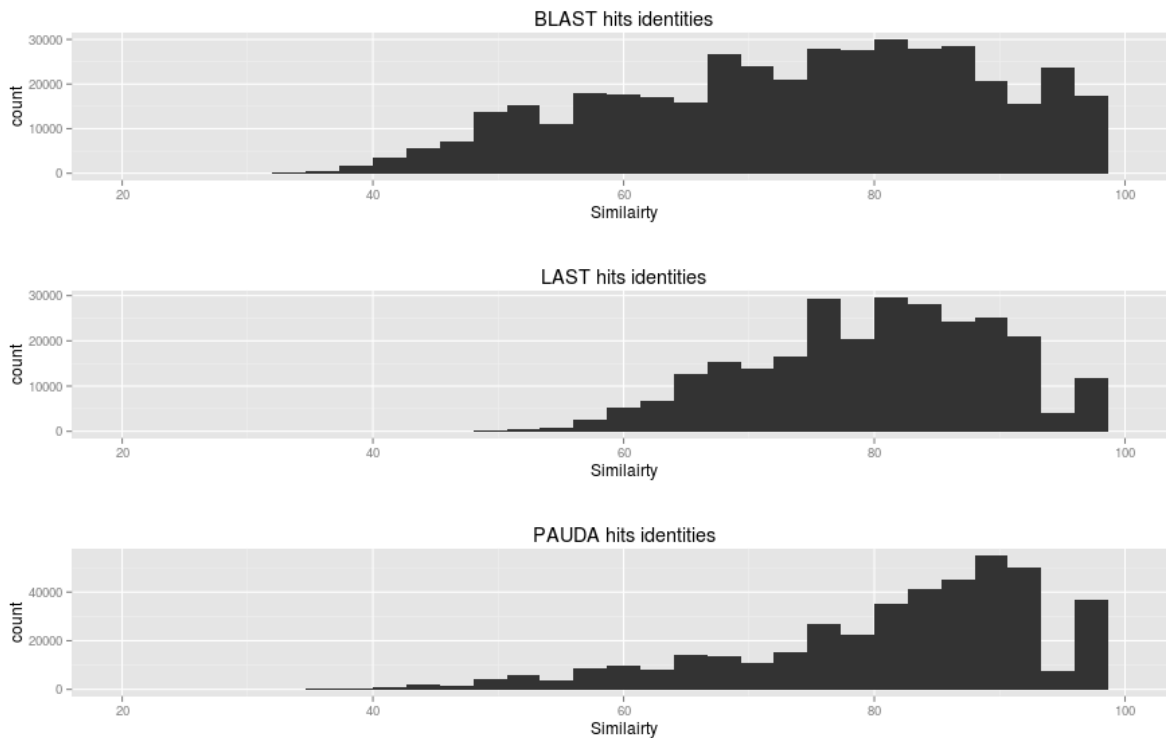


Figure II-6 : Comparaison des logiciels d'alignement Blast, Last et Pauda sur un échantillon aléatoire de 100000 séquences (P. Senin non publié).

Toutes les analyses bio-informatiques des séquences issues du séquençage NGS ont été réalisées en collaboration avec l'équipe génotoul de Toulouse.

6. ANALYSES STATISTIQUES

6.1. Analyse de la diversité alpha

Les indices de diversité de Shannon et de Simpson donnent une estimation de la richesse. Comme nous avons pu le voir dans le premier chapitre, ils sont mieux adaptés aux biais engendrés par les méthodes de séquençage haut débit que certains indices de richesse (Kunin *et al.*, 2010). Ils prennent en compte le nombre d'espèces mais également la distribution des individus au sein de ces espèces. Les indices de diversité ont été calculés à l'aide du logiciel Mothur (Schloss *et al.*, 2009).

L'indice de Shannon permet d'estimer la diversité en prenant en compte le nombre d'espèce et l'abondance des individus au sein de chacune de ces espèces. Cet indice est sensible aux variations des espèces les plus rares. Il est donné par la formule suivante :

$$H' = - \sum_{i=1}^{Sobs} \frac{ni}{N} \ln \frac{ni}{N}$$

Où :

$Sobs$ = Le nombre d'OTU observés

ni = le nombre d'individu par OTU

N = le nombre total d'individu dans la communauté

L'indice de Simpson mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce. Il est sensible aux variations d'importance des espèces les plus abondantes. Il est donné par la formule suivante :

$$D = \frac{\sum_{i=1}^{Sobs} ni (ni - 1)}{N(N - 1)}$$

6.2. Analyse de la diversité beta

Les clusters, diagrammes de Venn et heatmap ont été réalisés sur le logiciel R (R Development Core Team, 2013) afin de visualiser la diversité partagée au sein de plusieurs échantillons.

Les diagrammes de Venn ont été réalisés avec le package *VennDiagram* de Chen & Boutros, (2011).

Les distances de BrayCurtis ont été calculées entre les communautés avec la fonction « Vegdist » du package *Vegan* (Oksanen *et al.*, 2013). La distance de Bray-Curtis permet d'évaluer la dissimilarité entre deux échantillons donnés. Des clusters ont ensuite été réalisés avec la fonction « hclust » de *Vegan* en utilisant la méthode de Ward, cette méthode consiste à regrouper des classes de façon à ce que la variabilité entre les classes soit minimale.

6.3. Tests statistiques

Pour explorer les paramètres physico-chimiques des sites ainsi que les voies métaboliques des communautés après annotation avec KEGG et normalisation en divisant par le nombre total de séquences alignées à KEGG, des analyses en composantes principales (PCA) ont été réalisées à l'aide du logiciel R avec le package *FactoMimeR* (Lê *et al.*, 2008). Seules les variables dont le \cos^2 était supérieur à 0,5 sont affichées sur le cercle des corrélations des PCA.

Le package *DESeq* (Anders & Huber, 2010) a été utilisé pour faire des analyses différentielles sur les données métatranscriptomiques des tapis microbiens.

Nous avons testé l'influence des paramètres environnement sur nos communautés par des analyses canoniques de correspondance (CCA) parcimonieuse avec une procédure pas à pas. Elles ont été réalisées à l'aide du package *Vegan* sur le logiciel R.

Ce package a également été utilisé pour réaliser des tests de comparaisons multiples avec le test de Tukey HSD entre les quantifications des gènes et transcripts.

Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire de mathématiques appliquées de l'UPPA.

- CHAPITRE III -

**DIVERSITE, ACTIVITE ET FONCTIONNEMENT
DE DEUX TAPIS MICROBIENS PRESENTANT
DES CONTAMINATIONS EN
HYDROCARBURES CONTRASTEES**

CHAPITRE III : DIVERSITE, ACTIVITE ET FONCTIONNEMENT DE DEUX TAPIS MICROBIENS PRESENTANT DES CONTAMINATIONS EN HYDROCARBURES CONTRASTEES

1. INTRODUCTION

La pollution pétrolière présente une des principales menaces pour la vie marine et son écosystème. Les tapis microbiens ont fait l'objet de plusieurs études descriptives qui ont permis de mettre en avant leurs importantes capacités métaboliques. Leurs structures compactes où cohabite une grande diversité microbienne à l'échelle de quelques millimètres permettent un système relativement clos en termes de cycle des nutriments (van Gemerden, 1993). Leurs développement à l'interface eau-sédiment dans les environnements contaminés par des hydrocarbures a été plusieurs fois reporté (Barth, 2003; Paissé *et al.*, 2008). De plus leur ubiquité et l'important potentiel métabolique des tapis microbiens ont mené à plusieurs études sur l'impact des pollutions pétrolières sur les tapis microbiens. Certaines études ont porté sur la composition structurale de communautés bactériennes d'environnements côtiers contaminés par des hydrocarbures par expérimentation en microcosmes ; la mise en place rapide de microorganismes affiliés aux genres de *Gammaproteobacteria* connus pour leur potentiel de dégradation y a été décrite. Relativement peu d'études de diversité des tapis microbiens contaminés par des hydrocarbures ont été entreprises *in situ*, et d'autant moins portent sur des pollutions anciennes et chroniques où les communautés ont pu s'adapter (Abed *et al.*, 2007; Paissé *et al.*, 2008).

Ce premier chapitre apporte une description globale de la communauté bactérienne et archéenne de deux tapis microbiens situés dans la même zone géographique, sur l'étang de Berre, mais présentant des contaminations pétrolière différentes. Une description physico-chimique complète a été menée afin de suivre dans le temps au travers de quatre campagnes de prélèvement menées sur deux ans l'évolution de la contamination ainsi que celle des communautés présentes. De nouvelles techniques de métagénomique et de métatranscriptomique sont ici employées afin de décrire l'assemblage et le fonctionnement de ces tapis microbiens et de comprendre l'impact du pétrole sur leurs métabolismes.

Cette étude est issue de la collaboration des différents partenaires du projet FUNHYMAT, elle est présentée sous forme d'un article qui sera soumis pour publication.

2. DIVERSITE, ACTIVITE ET FONCTIONNEMENT DE DEUX TAPIS MICROBIENS AYANT DES CONTAMINATIONS EN HYDROCARBURES CONTRASTEES

Ce travail est présenté sous la forme d'un article en préparation qui sera soumis pour publication sous le titre :

Diversity, activity and functioning of two microbial mats contrasted by their hydrocarbon contamination

Par : Johanne Aubé, Pavel Senin, Patricia Bonin, Olivier Pringault, Bruno Deflandre, Christophe Klopp, Rémy Guyoneaud, Marisol Goñi-Urriza

2.1. Introduction

Microbial mats dominated by cyanobacteria are considered as the oldest structured ecosystem on earth. Their fossils form (stromatolites) have been dated to approximately 3.5 billion years old (van Gemerden, 1993). They can be regarded as relatively auto-sufficient systems in terms of nutrient cycling, they concentrated high taxonomic and metabolic diversity within few millimetres scales (Bolhuis & Stal, 2011). Microbial communities are stratified by steep gradients of light, oxygen, sulfide and pH, the metabolism of these communities participate to these gradients. Major functional groups in photosynthetic microbial mats are photolithoautotrophs, aerobic/anaerobic heterotrophs, fermenters, sulfide oxidizers and methanogens (van Gemerden, 1993). Cyanobacteria have key role within photosynthetic mat. They are the precursor of the microbial mat, they fix the dinitrogen and the carbon dioxide and support the growth of the microbial mat community (Severin & Stal, 2010). The exopolysaccharide excreted by Cyanobacteria form the main structural element of microbial mats (van Gemerden, 1993).

Microbial mats can be found in a diverse range of environment around the world including hot springs (Coman *et al.*, 2013; Roeselers *et al.*, 2007), polar ponds (Vincent, 2002) and hypersaline waters (Allen *et al.*, 2009; Dillon *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2013). They also have been observed in petroleum contaminated areas (Barth, 2003; Paissé *et al.*, 2008). Laboratory experiment showed an efficient aliphatic and aromatic compound degradation when microbial mat were incubated with crude oil (Benthien *et al.*, 2004; Raghukumar *et al.*, 2001); Degradation occur mainly in the upper part of the mat, dominated by cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria (Abed *et al.*, 2002). However, in natural

ecosystems, mats could preserve the petroleum from photoxydation (Garcia de Oteyza & Grimalt, 2006) since it remains trapped in the anoxic/aphotic layer of the mats. Finally, microbial mats show a high resilience capacity after a petroleum contamination (Bordenave *et al.*, 2007), suggesting that the petroleum do not impact so much the structure and functioning of the microbial mats.

The aim of this study is to describe the structure of the present and active part of the prokaryotic community in two photosynthetic microbial mats presenting different hydrocarbon contamination. The archaeal structure in microbial mat being poorly characterized, we applied high throughput sequencing of the 16S rRNA gene and transcripts of bacteria and archaeal communities. We also describe the main metabolisms of these microbial mats by systematic sequencing of the metagenome and the enriched mRNA metatranscriptome. The analyses were performed in spring and autumn in order to assess seasonal variations of the structure and functioning of mats, and to determine the impact that could have the hydrocarbon contamination in the mats.

2.2. Material and methods

2.2.1. Sampling sites and procedure

Berre lagoon is located on the south French coast of the Mediterranean Sea near Marseille. Microbial mat samples were collected in two sites in the lagoon: a contaminated station located in a retention basin receiving hydrocarbon wastewaters from a petrochemical industry and in a pristine station located in a Bird reserve “Les salins du Lion”. Four sampling campaigns were realized: two in spring (April 2011 and 2012) and two in autumn (September 2011 and 2012) named respectively C0 and C2 for April sampling and C1 and C3 for September sampling. The two first centimeters of sediment were collected for molecular analysis and stored at -80°C until analyses. Sediment samplings were realized for hydrocarbon analysis with glass container and for metals and other chemical analysis with polypropylene container.

2.2.2. Physical and chemical analyses

Metals, transition metals and hydrocarbon analyses in sediments were performed as described by Aubé *et al.*, (submitted). Sulfates and hydrogen sulfide were quantified in overlaying water with the method described in Kolmert *et al.* (2000) and with the methylene blue method (Cline, 1969) respectively. Total carbon (TC) and sulfur (TS) contents were measured on freeze-dried sediments by infrared spectroscopy using a LECO C-S 125. Organic

Carbon (OC) content was similarly measured on freeze-dried material after removal of carbonates with 2M HCl from 50 mg of powdered sample (Etcheber *et al.*, 1999; Pastor *et al.*, 2011). Total nitrogen (TN) content in the sediment was measured on freeze-dried material by combustion using an automatic Thermo Finnigan EA 1112 Series Flash Elemental analyzer. The reproducibility of these measurements was better than 5%. C/N ratios were expressed as atomic ratios. Redox potential, pH, salinity and dissolved oxygen were measured in situ (pH/MVMETRE 340 from WTW, refractometre Atago S10 and electrode CelOX325 respectively). Net photosynthesis (NP), Areal rates of gross photosynthesis (AGP) and dark and light Respiration (R), were measured on microbial mats as describe by (Pringault *et al.*, submitted). NH_4^+ , NO_2^- and NO_3^- pore water (P/W) and the potential and total denitrification and the nitrogen fixation were measured as describe by (Bonin & Michotey, 2006).

2.2.3. DNA/RNA extraction and cDNA synthesis

DNA and RNA coextraction were performed in triplicate using RNA PowerSoil Total RNA Isolation kit (MO BIO) coupled with AllprepDNA/RNA mini kit and RNase-Free DNase Set (QIAGEN). RNA qualities were verified using RNA nano chip on a Bioanalyzer 2100 (Agilent), RIN upper 7 were obtained. Absence of DNA contamination within RNA samples was determined by PCR amplification of RNA without reverse transcription step. cDNA synthesis were realized on RNA using M-MLV RT and RNase OUT (Invitrogen) with 1 μL of RNA. Reverse transcription was performed for 2h at 42°C with random primers (1 μL at 5U/ml) according to manufacturer's instructions.

2.2.4. Quantification of genes and transcripts

16SrRNA genes and transcripts of archaea and bacteria were quantified using the DyNAmo Flash SYBR Green qPCR kit (Thermo scientific) in a Mx 3005PTM (Stratagene) as described by (Paissé *et al.*, 2012) using bac1055YF and bac1392R primers (Ritalahti *et al.*, 2006) for *bacteria* and arch349F and arch806R primers (Takai & Horikoshi, 2000) for *archaea*. PCR products were cloned in the pCR2.1 Topo TA cloning kit (Invitrogen) to generate the standard curve for gene number quantification. The standard curve for the transcript quantification was performed with the cDNA obtained after in vitro transcription. The cloned PCR product were transcript in vitro, using the Megascript® kit (Mobio) and reverse transcript using the conditions described above in order to obtain cDNA for the standard curve of transcript quantification. Reactions were cycled as described by Paissé *et al.*, (2012) with an annealing temperature of 50°C and 58°C for *bacteria* and *archaea* respectively for 30 s. Analysis was performed as described in Paissé *et al.*, (2012). PCR

efficiencies varied between 82.3% and 103%. The correlation factors (r^2) were higher than 0.994 in all reactions. Genes abundance and expression level between sites were compared using analysis of variance and Tukey's honest significant differences (HSD) tests with the MASS package (Ihaka & Gentleman, 1996) in the R software.

2.2.5. Gene and transcripts sequencing

In order to determine the bacteria and archaeal communities compositions the 16SrDNA bacterial gene and cDNA were amplified with primers 104F and 530R (Jami & Mizrahi, 2012) whereas the 16SrRNA archaeal gene and cDNA were amplified with the above defined primers for qPCR. Amplicons were sequenced using the MiSeq 250-paired technology (Illumina) and analysed as described by Aubé et al. (submitted). Operational taxonomic units (OTUs) were defined with a maximum distance of 3%.

2.2.6. Whole metagenome and metatranscriptome sequencing and bioinformatics procedures

The BioScientific PCR-free kit was used to construct the genomic DNA libraries following the manufacturer's protocol. RNA-seq libraries were prepared according to Illumina's protocols on a Tecan EVO200 liquid handler. The IlluminaTruSeq Stranded mRNA sample prep kit was used to analyze RNA after mRNA enrichment using Epicentre RiboZero kit, as described by Aubé *et al.*, (submitted). All filtered reads (DNA and mRNA) were aligned to KEGG genes database using the Last aligner v392 (Frith *et al.*, 2010). Each read were then annotated using the single-directional best hit information method (Moriya *et al.*, 2007).

2.2.7. Statistical analysis

All the analyses were realized in triplicate. For molecular analysis, we first performed a cluster analysis using Bray Curtis distances (Vegan package, R) (Oksanen *et al.*, 2013) using the OTUs tables as variables, in order to assess the homogeneity of the replicates. For all the analyses performed, the variability between replicates was much lower than between samples. Replicates were then gathered and 100 successive random samplings of communities with a size corresponding to the minimum of sequences per replicate were realized in order to obtain the maximum of the diversity from the samples (Aubé et al., submitted). Following analyses were realized using these normalized data. Taxonomic richness and diversity estimators were calculated using Mothur software package (Schloss *et al.*, 2009). Cluster analyses were performed using Bray Curtis distances (Vegan package, R). Site descriptions

were realized by Principal component analysis using the FactoMineR package (Lê *et al.*, 2008) and CCA (Vegan package, R) were used to find the environmental parameters that best explained the diversity of our present and active community. KEGG data to performed PCA were normalized by dividing the number of hits for each category by the total number of hits. PCA was performed with the normalized data using the FactoMineR package, variable with \cos^2 below to 0.5 are not shown on the PCA. Differential gene expression analyses were performed using the metatranscriptome with the DESeq package (Anders & Huber, 2010).

2.3. Results

2.3.1. Site descriptions

The main physical-chemical parameter differentiating the sites is the hydrocarbon contamination, as we expected. This parameter crushed the differences between other environmental parameters. In order to describe the differences between sites, we performed different PCA analyses. When taking into account the basic environmental parameters (Figure III-1a), sites were separated along the axis 2, SL site showed high raw production whereas EDB1 high total carbon and organic carbon contents. Both sites showed high metal contents, but a clear separation could be observed (Figure III-1b) along the axis 1 with high concentrations of Cu, Zn, Ni, As, Pb, Fe, Cr and Sn on EDB1 whereas SL presented high cadmium concentration. A temporal separation was observed along the axis 2, both site contained high Hg and Al concentrations at C2 mission. However, the main difference results in the extremely high hydrocarbon contents in the retention basin. A modification of the hydrocarbon contents was observable over time (Figure III-1c); short chain alkanes (<C28) dominated the hydrocarbons at mission one, mission two contains mainly medium weight PAHs, and last campaign contained heavy PAHs. The percentage of HAPs increased along the campaigns; they accounted for 61,47% of the total hydrocarbon in the campaign 1 and 89,92% in the last campaign.

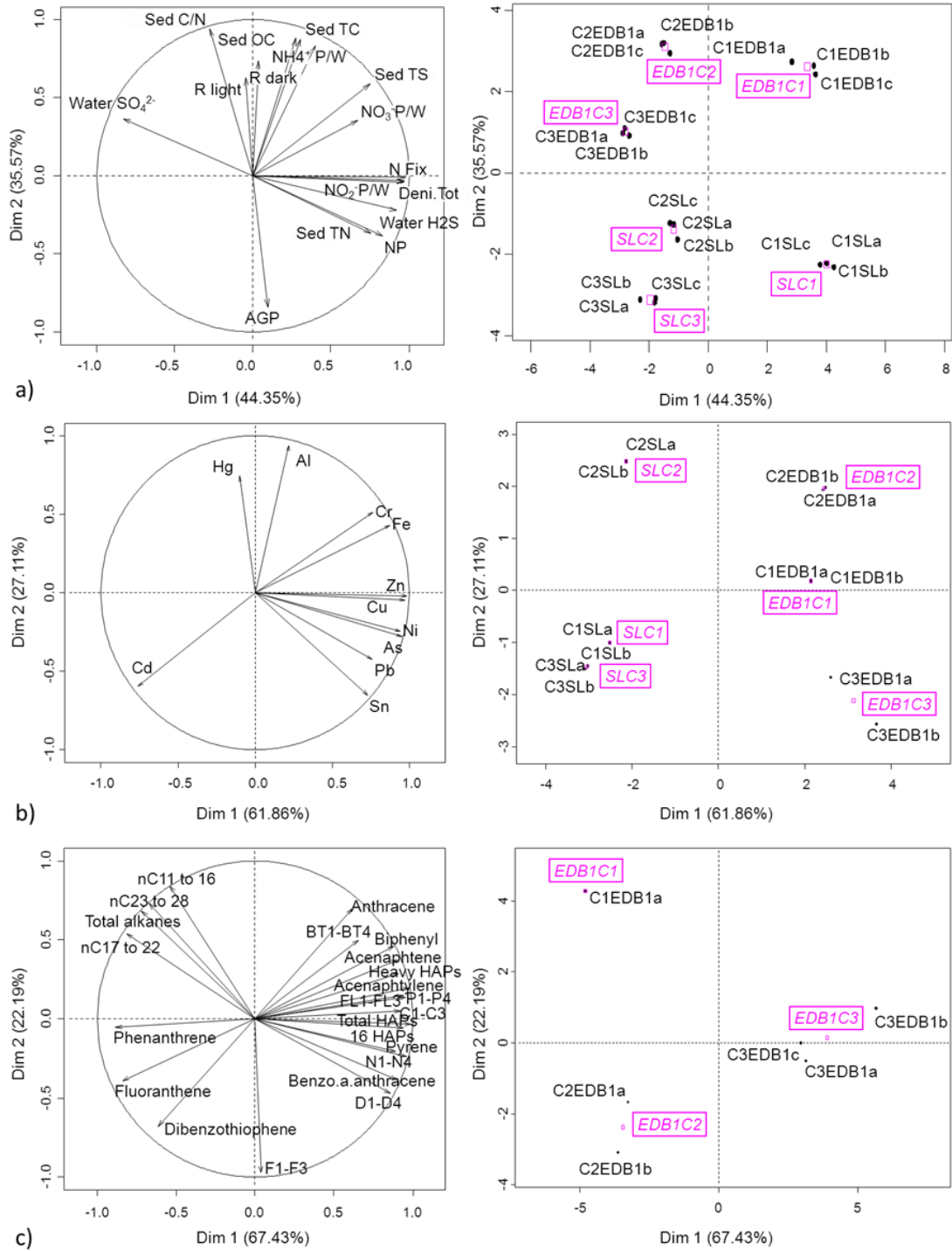


Figure III-1: Principal component analysis of parameters describing EDB1 and SL sites based on physicochemical parameters (a), metal contents (b) and hydrocarbon contents for EDB1 site (c). Replicates were given in black and averages of replicates in pink boxes. Abbreviations are: AGP, Areal rates of gross photosynthesis; BT1-BT4, C1 to C4-benzo(b)thiophenes; C1-C3, C1 to C3-chrysenes; C/N, carbon/nitrogen; Deni Tot, denitrification total; N Fix, nitrogen fixation; D1-D4, C1 to C4-dibenzothiophenes; FL1-FL3, C1 to C3-fluoranthenes/pyrenes; N1-N4, C1 to C4-Naphtalenes; NP, net photosynthesis; OC, organic carbon; P1-P4, C1 to C4-phenanthrenes/anthracenes; P/W, Pore Water; R respiration; Sed, sediment; TC, total carbon; TN, total nitrogen, TS, total sulfur.

Bacteria abundance (16SrRNA gene quantification) ranged from 1.7.10¹⁰ to 7.1.10¹⁰ copies.g⁻¹ of dry sediments, with only slight differences (Tuckey HSD test), EDB1 and SL C0 showing less bacterial abundances than SL C2 and SL C3. Lower Archaeal abundances were also observed in C0 for both sites but principally for EDB1 C3 (Figure III-2). As for gene quantification, bacterial and archaeal activities (16SrRNA transcripts quantification) were similar between samples. A noticeable lower value was observed for EDB1 C3 for archaeal transcript copies.

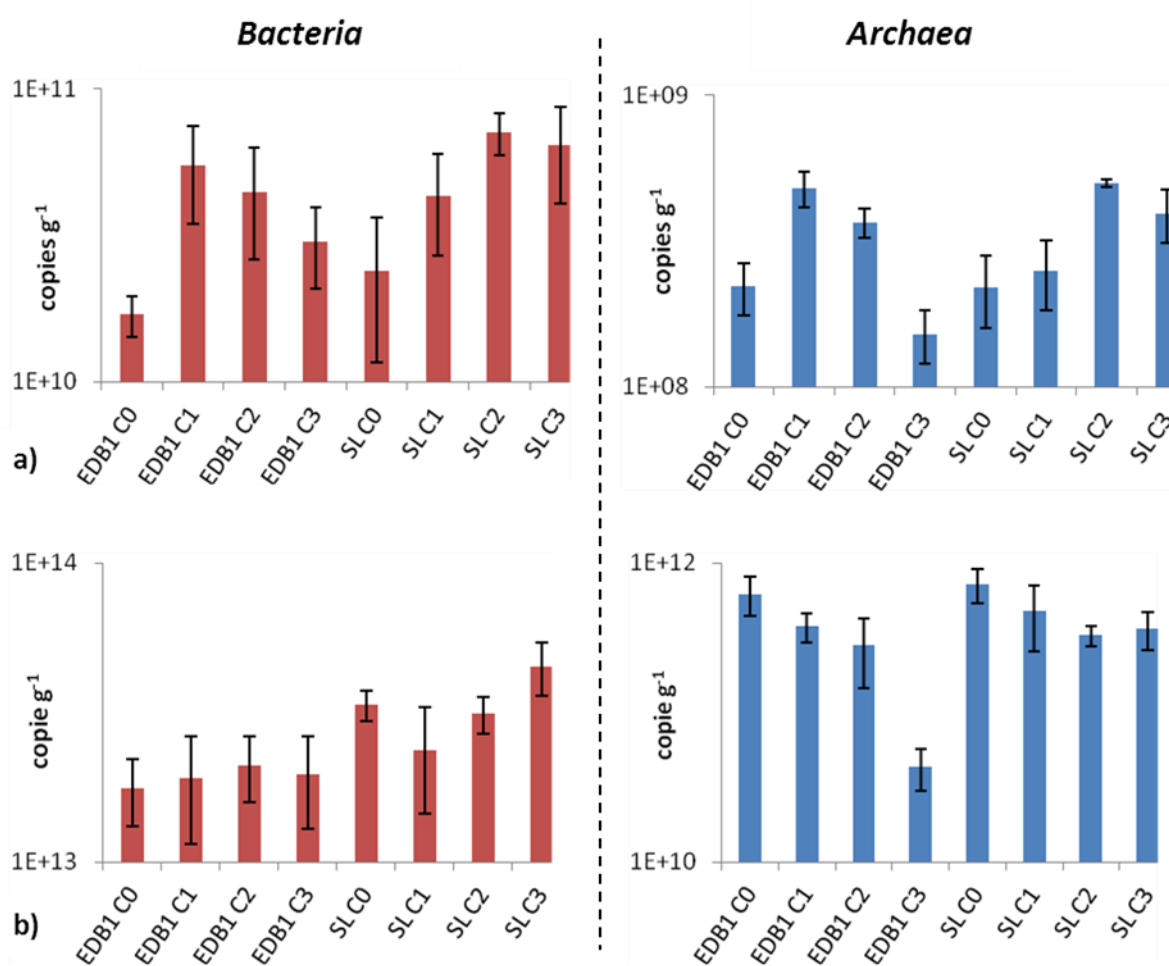


Figure III-2: Abundance of 16S rRNA genes (a) and transcripts (b) across the two sites on the four campaigns. Abundance is given in number of copies per g of dry sediments. Error bars represent the standard deviation.

2.3.2. Diversity of bacterial communities

High bacterial diversity was observed for all the samples except for EDB1 C3 community (Table III-1). Although a clustering of the communities within sites was observed (Figure III-3), EDB1 C3 community differed from the other EDB1 samples, as well as for the whole community as for the active part. Within a site, the samples were discriminated by the sampling season, communities from spring or autumn clustered together, except for the EDB1 C3 community which was divergent. A total of 1826 OTUs were shared in SL samples, they accounted from 64.40% to 75.59% of the relative abundance, depending on samples. Because of the EDB1 C3 sample, only 314 OTUs were shared, accounting only for 26.41% to 45.18% of the EDB1 communities. Excluding this sample, 2524 OTUs were common to EDB1 samples, representing 71.67% to 77.39% of the EDB1 bacterial community.

Table III-1 : Observed prokaryotic richness and diversity estimates based on 97% OTU clusters

		<i>Bacteria</i>			<i>Archaea</i>			Ratio Sobs B:A
		Richness estimator	Diversity estimators		Richness estimator	Diversity estimators		
		S _{obs}	Shannon	Simpson	S _{obs}	Shannon	Simpson	
Genes	EDB1 C0	6701	7,23	0,003	3438	6,53	0,004	1,95
	EDB1 C1	6352	7,05	0,003	3146	6,54	0,004	2,02
	EDB1 C2	6158	6,93	0,004	2389	6,16	0,006	2,58
	EDB1 C3	1788	4,59	0,032	ND	ND	ND	ND
	SL C0	6979	7,18	0,003	3174	6,47	0,004	2,20
	SL C1	6125	6,78	0,005	2908	6,36	0,004	2,11
	SL C2	5832	6,99	0,003	2821	6,14	0,009	2,07
	SL C3	5264	6,67	0,006	2986	6,46	0,004	1,76
Transcripts	EDB1 C0	5498	6,94	0,005	3020	6,02	0,010	1,82
	EDB1 C1	3831	6,31	0,008	3185	6,54	0,005	1,20
	EDB1 C2	4347	5,81	0,022	2488	5,91	0,010	1,75
	EDB1 C3	1451	4,20	0,042	241	2,16	0,245	6,02
	SL C0	5045	6,55	0,007	2852	5,43	0,027	1,77
	SL C1	4452	6,17	0,010	2965	6,19	0,007	1,50
	SL C2	4663	6,21	0,011	2604	5,86	0,012	1,79
	SL C3	4223	5,08	0,051	2806	6,40	0,006	1,50

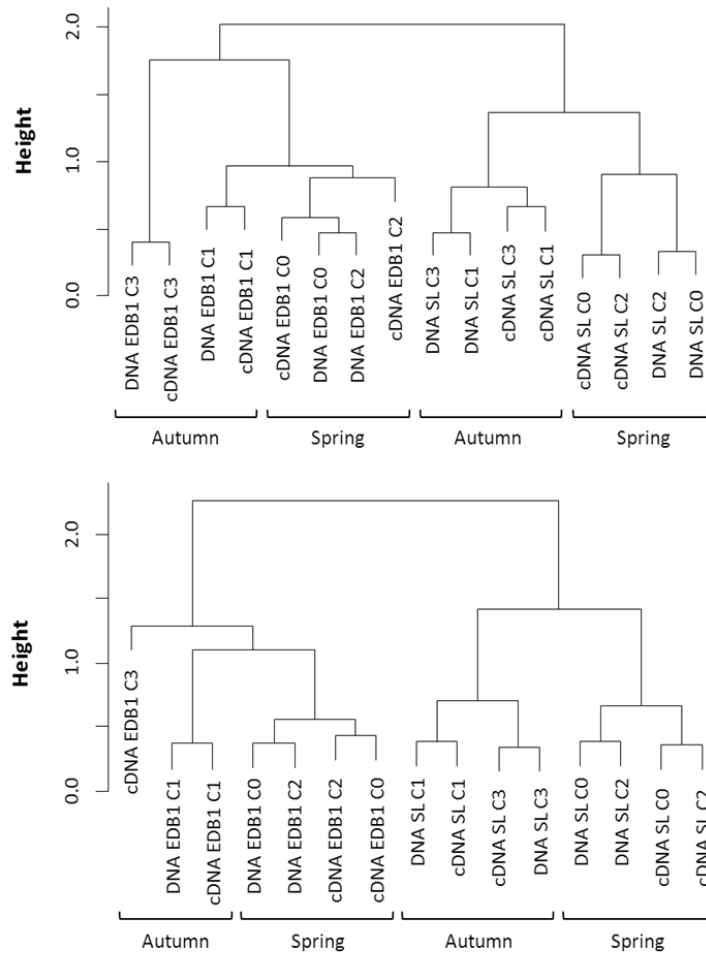


Figure III-3: Clustering of *Bacteria* (a) and *Achaea* (b) communities presents (DNA) and actives (cDNA).

The observed OTUs were affiliated within 57 different phyla (including candidate phyla). The dominant phyla in both sites were *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and, *Chloroflexi* and *Firmicutes* for SL site (Figure III-4a). Among the *Proteobacteria*, the *Deltaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* dominated. The *Deltaproteobacteria* consisted mainly of organisms belonging to the family of *Desulfobacteraceae* and *Desulfobulbaceae* whereas *Gammaproteobacteria* belonged mainly to the *Chromatiaceae*, *Alteromonadaceae* and to the OM60 clade. *Chloroflexi* sequences were mainly related to the *Anaerolineaceae* a non-photosynthetic bacterium. *Bacteroidetes* were represented by *Rhodothermales*, *Flavobacteriales*, *Saprospirales* and *Sphingobacteriales*. Sequences related to *Saprospiraceae* were particularly numerous in EDB1 C3, but were also commonly found in autumn samples. A seasonal variation was also observed for other groups, such as for *Rhodobacteraceae* (*Alphaproteobacteria* class) related sequences, more abundant in autumn samples.

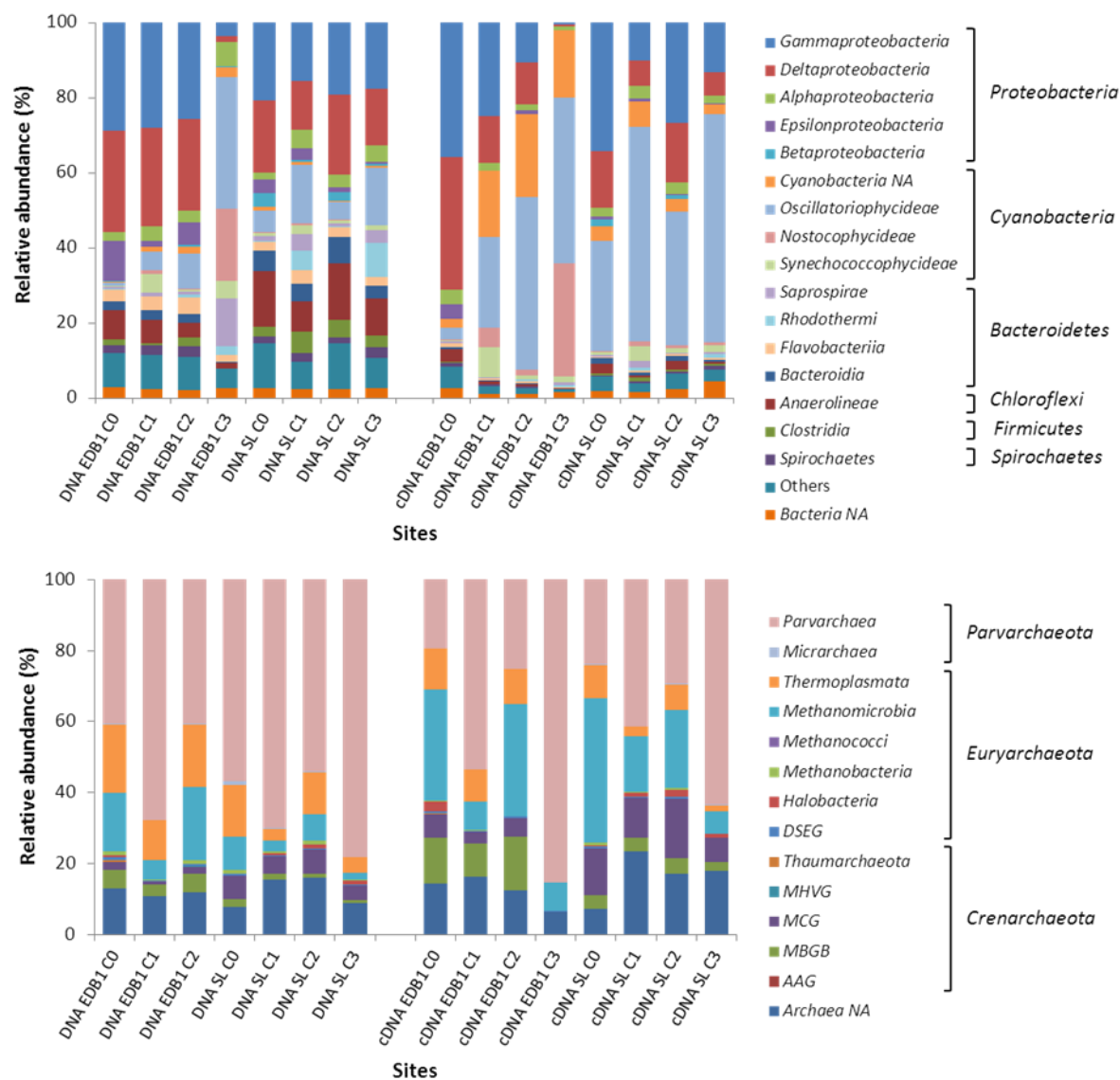


Figure III-4 : Taxonomic affiliation of the 16SrRNA gene and transcripts of *Bacteria* (a) and *Archaea* (b) at the class level.

The sample EDB1 C3 was clearly different. Its specific OTUs represented 3.72% and 12.61% of the relative abundance of genes and transcripts respectively, whereas they accounted for less than 0.05% for other samples (Figure III-5). The *Cyanobacteria* (61%) dominated the present and active communities, affiliated within the *Phormidiaceae*, *Saprospiraceae* and *Rivulariaceae*. OTUs 13963, 20343 and 331 affiliated with the *Rivulariaceae* and OTUs 1, 24698 and 23696 affiliated within the *Phormidiaceae*. They were characteristic to EDB1 and highly dominant in C3 sample.

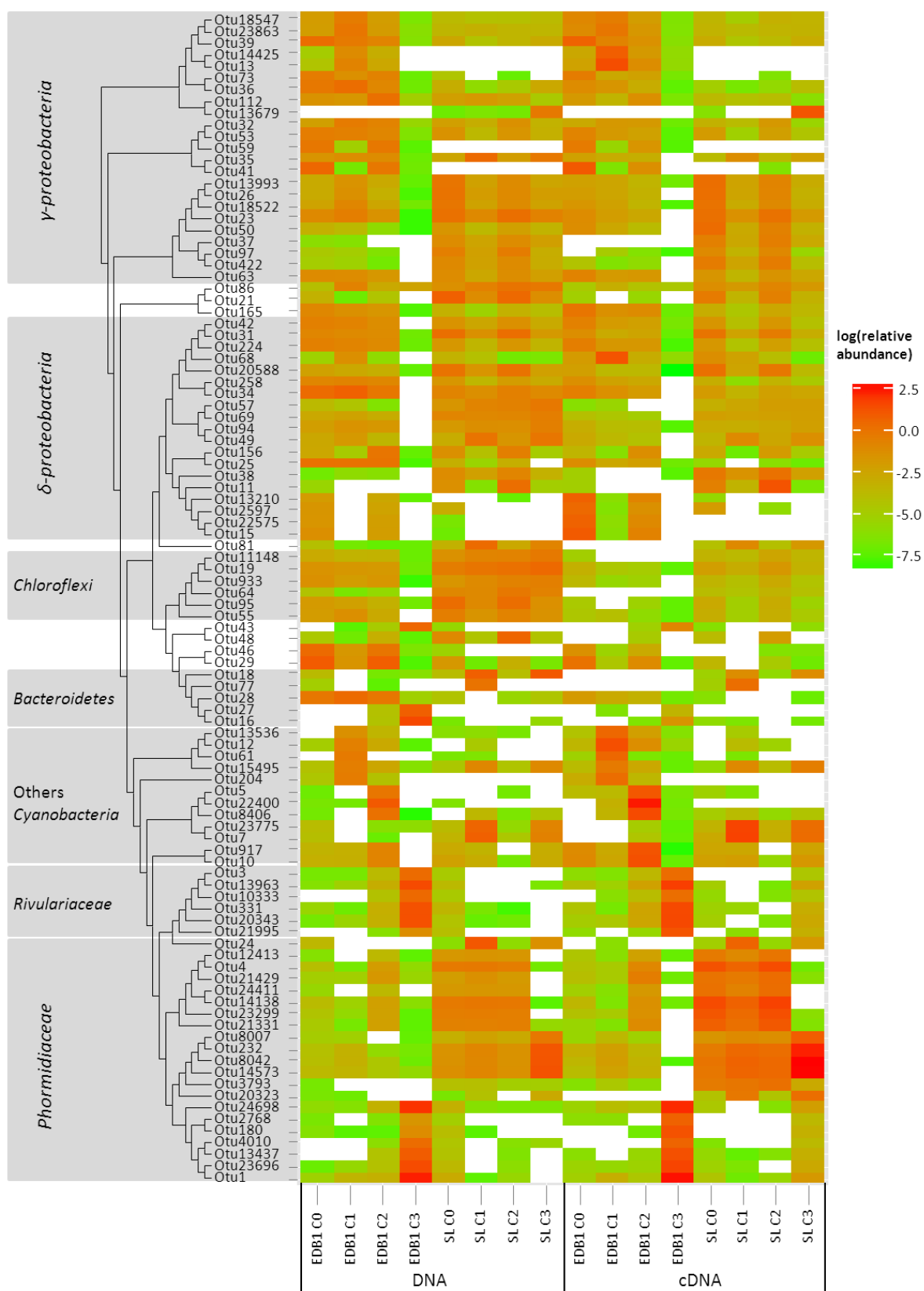


Figure III-5: Heatmap representation of the relative abundance of the 100 most abundant OTU among bacteria 16S rRNA genes and transcripts. A white background indicates no hits for the OTU. A neighbour joining phylogenetic tree of nucleic similarity clustered representative sequences of OTUs.

Excluding EDB1 C3 sample, EDB1 community was dominated by the *Chlorococcales* (OTUs 8406, 10, 917, and 5), the *Oscillatoriales* (OTUs 12 and 22400), the *Helicobacteraceae* (OTUs 29 and 46), the *Desulfobacterales* (OTUs 34 and 25) and the *Flavobacteriales* (OTU 28). Seasonal variations could be observed for some OTUs, such as OTUs affiliated with the *Helicobacteraceae*, that showed higher abundances and activities in spring samples than in autumn samples (from 0.20% to 2.66% of the relative abundance); similar trend was observed in SL mats, although those OTUs were minor. On the contrary, a peak of the *Oscillatoriales* was observed during the campaign two sampling (autumn), with the OTU 22400 accounting for 2.85% of the relative abundance of genes and up to 11.81% of the transcripts. Considering all the *Cyanobacteria* related OTUs, the relative abundance of *Cyanobacteria* within the active community increased progressively over time accounting for 6.01% of the transcripts for the campaign 0, 55.21% for campaign 1, 70.65% for campaign 2 and dominated completely the last campaign with 93.95% of the transcripts. Beside de *Cyanobacteria*, sulfate-reducing bacteria related OTUs were among the most abundant OTUs. They were affiliated with unclassified *Desulfobacteraceae* (OTUs 68) and with unclassified *Desulfobulbaceae* (OTUs 15; 13210; 22575 and 2597). These later OTUs showed seasonal variations with higher abundances and activities in spring samples (Figure III-5).

The SL community showed important seasonal variations, with higher abundances and activities of *Proteobacteria*, mainly the *Gamma*- and *Deltaproteobacteria* in spring campaigns (Figure III-5). For the *Gammaproteobacteria*, the increase was particularly important for the OTUs related to the genus *Thiocapsa* (OTUs 422; 97) and to unclassified *Chromatiaceae* (OTUs 23; 26; 13993; and 18522). For the *Deltaproteobacteria*, the abundant and active OTUs in spring were related to the genus *Desulfococcus* (OTUs 31; 224 and 42), to unclassified *Desulfobacteraceae* (OTUs 20588 and 34) and to unclassified *Desulfobulbaceae* (OTUs 11 and 38). *Thiobacillus* genus (OTU 21, *Betaproteobacteria*) was as well more abundant and more active in spring campaigns. In autumn, the *Cyanobacteria Phormidiaceae* related OTUs were more abundant and active, but the OTU varied: OTUs 24, 7 and, 23775 were more abundant and active in C1 autumn sampling whereas OTUs 8042; 14573 and 232 were abundant in the C3 autumn sampling (up to 10.71% of SL C3 transcripts for the more active OTU). Dominant OTU 18 affiliated with the KSA1 genus (*Rhodothermales*) were also more abundant (>2.33%) and active (>0.30%) in autumn samples.

Some OTUs within the *Gammaproteobacteria* class were related to oil degrading bacteria as OTU41 affiliated to *Cycloclasticus* sp. BG-2 with 98% of identity or OTU 39, 59

and 73 related to uncultured *Gammaproteobacteria* bacteria isolated from petroleum contaminated sites. Those OTUs were more abundant and more active in contaminated site, OTU41 represented up to 2.84% of the transcripts in EDB1 C0, and was the most active OTU among the *Gammaproteobacteria* for this campaign. *Alcanivorax* related OTUs were rare in EDB1, representing less than 0,16% of the bacterial community and 0,039% of transcripts. OTUs related to this genus were also observed in the pristine site, but was found active only in campaigns 2 and 3. Other hydrocarbonoclastic related OTUs were observed in some samples, such as 3844 related to *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, but was globally more abundant and more active in the uncontaminated site, accounting up to 0.008% of the transcripts. Among *Deltaproteobacteria* no oil degrading related OTUs could be observed, however OTU 68 related to an unclassified *Desulfobacteraceae* shared 95% of identity with a clone identified from an oil polluted system. The description of the putative bacteria involved in hydrocarbon degradation was limited because less than 1% of the sequences could be affiliated up to the species level.

2.3.3. Diversity of archaeal communities

Archaeal community diversity follows the same trend that bacterial one, although its richness was lower (Table III-1). The abundance of archaea was too low to be detected in the amplicon pool of EDB1C3. A first clustering was observed related to the sample origin and a second level of clustering related to the season (Figure III-3b). Near 50% of the OTUs were common to both sites for all the seasons (1577 OTUs for EDB1, 1200 OTUs for SL), and represented from 81.34% to 90.51% for EDB1 and from 71.47% to 83.64% for SL of the relative abundance.

Three main phyla were detected, the *Parvarchaeota*, the *Euryarchaeota* and the *Crenarchaeota* (Figure III-4b). The *Parvarchaeota* were mainly affiliated to the YLA114 order. OTUs 3 affiliated to this order accounted for almost half of the transcripts in the sample EDB1 C3. The *Euryarchaeota* principally affiliated with methanogens and with *Thermoplasmata* were more abundant and more active in spring. Among the methanogens, the *Methanosarcinales* and the *Methanomicrobiales* dominated. *Crenarchaeota* phylum was present at both sites, represented by the Marine Benthic Group B (MBGB) mainly in EDB1 and by the Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG) in SL. Finally, the OTUs 4 and 9, highly actives in SL (up to 6.26% of the relative abundance of the transcripts), could not be affiliated below the kingdom.

2.3.4. Bacterial and Archaeal communities are affected by the environmental parameters

Neither the bacterial nor the archaeal community structure and activity could be related to natural environmental factors, such as temperature, salinity, pH and conductivity. Nevertheless, CCA analysis performed with OTU data, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and total hydrocarbon in sediment indicated that sediment hydrocarbon contents were the main variable measured that explained significantly the structure of the bacterial community distribution (Figure III-6a) and the active part of the bacterial and archaeal community as well (Figure III-6c and d). EDB1 site was associated to high PAHs and total hydrocarbons contents. Besides PAHs, metals influenced significantly as well the structure of the prokaryotic community of EDB1: the Pb contents affected bacterial gene and archaeal transcripts in C3, and the Zn contents the archaeal community.

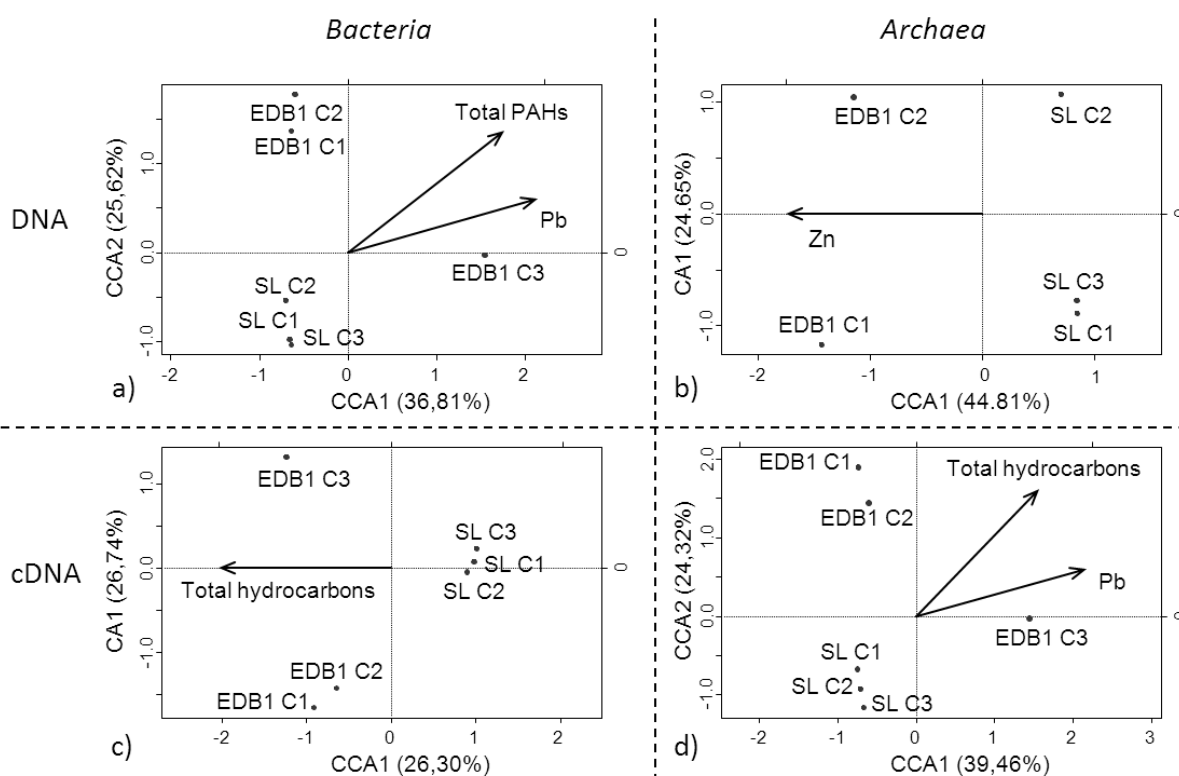


Figure III-6: CCA between the 16SrRNA gene of the bacterial (a) and archaeal (b) communities and the transcripts (bacteria (c) archaea (d)) of each sampling and the biogeochemical parameters

2.3.5. Metabolism of the microbial mat communities

Microbial mat's metagenome and metatranscriptome were analysed using KEGG database in order to determine their metabolism. Last comparison of all sequences yielded to hit about 36% of the sequences to the KEGG database, representing 14877 Kegg Orthology (KO) groups. From this annotated sequences 35.96 to 36.72% could not be affiliated to any pathways, but most of the sequences (45.26 to 46.14%) matched genes involved in metabolic pathways (Figure III-7). The microbial mat metagenome encode genes involved in carbohydrate (mainly in Glycolysis / Gluconeogenesis and in the tricarboxylic acid cycle) and amino acid metabolisms. Energy metabolism related sequences represented only 4.66 to 4.92% of the metagenome but up to 50.62% of the sequence in the metatranscriptome.

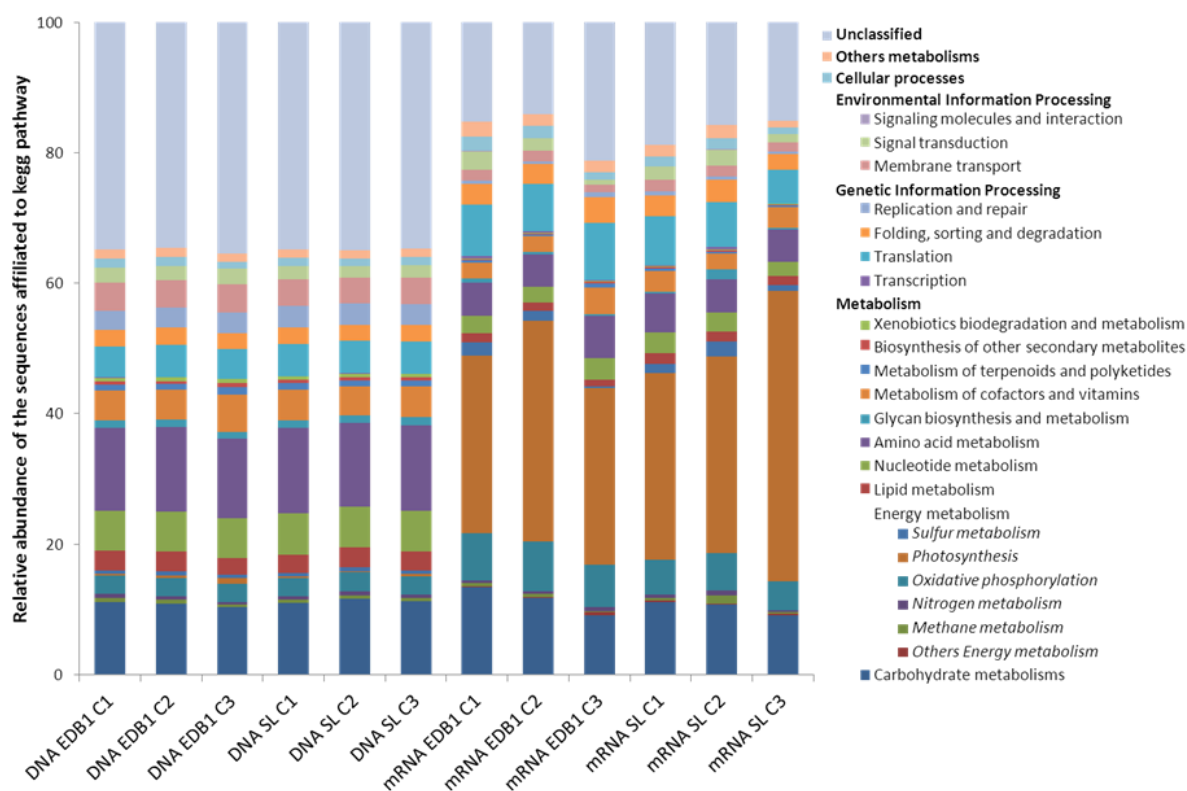


Figure III-7 : KEGG metabolic analysis of the metagenome and metatranscriptome of both microbial mats. Data represent the mean of replicates.

Transcripts sequences were mainly related to photosynthesis. EDB1 C3 microbial mat had a clearly different metabolism from the other samples, showing higher abundance of gene involved in photosynthesis whereas others samples showed higher abundance of sulfur, methane and nitrogen metabolism (Figure III-8). Sequences related to nitrogen metabolism were mainly involved in nitrogen fixation (nitrogenase enzyme complex) whereas those of the

sulfur metabolism were related to sulfate reduction (AprAB and DsrAB). EDB1 samples contained globally higher abundances of gene related to the xenobiotics biodegradation and metabolism pathways KEGG categories.

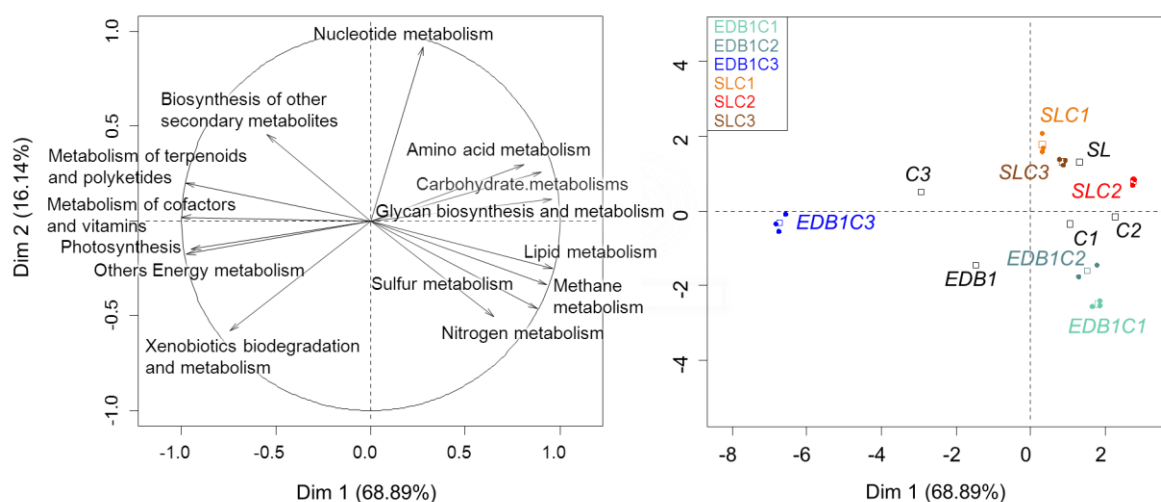


Figure III-8 : PCA of the metagenomes annotated with the KEGG metabolic categories. Each full dot represents a replicate.

13522 KO genes were detected transcribed, differential gene expression analyses were performed on microbial mats metatranscriptoms in order to characterize the main differences in genes expressions between sites. 19 out of the 100 genes significantly more express ($p_{adj} < 0.1$) in contaminated mat were related to xenobiotic biodegradation (Figure III-9), most of them were involved in the activation of the hydrocarbon molecule, such as the toluene monooxygenase system protein A, the ethylbenzene dioxygenase and the benzylsuccinate synthase. Genes involved in alkane degradation were also more expressed in the contaminated site: *alkB* coding for the alkane 1-monooxygenase classified within the lipid metabolism pathway by KEGG, were found more expressed in the contaminated site. A decrease of the expression level of these genes was observed over time (Figure III-10). The less contaminated SL site showed higher abundance of the 3-hexulose-6-phosphate synthase and 6-phospho-3-hexuloisomerase both related to the pentose phosphate pathways. Over expressed genes were as well related to fructose and mannose metabolism and glycolysis / gluconeogenesis (data not shown).

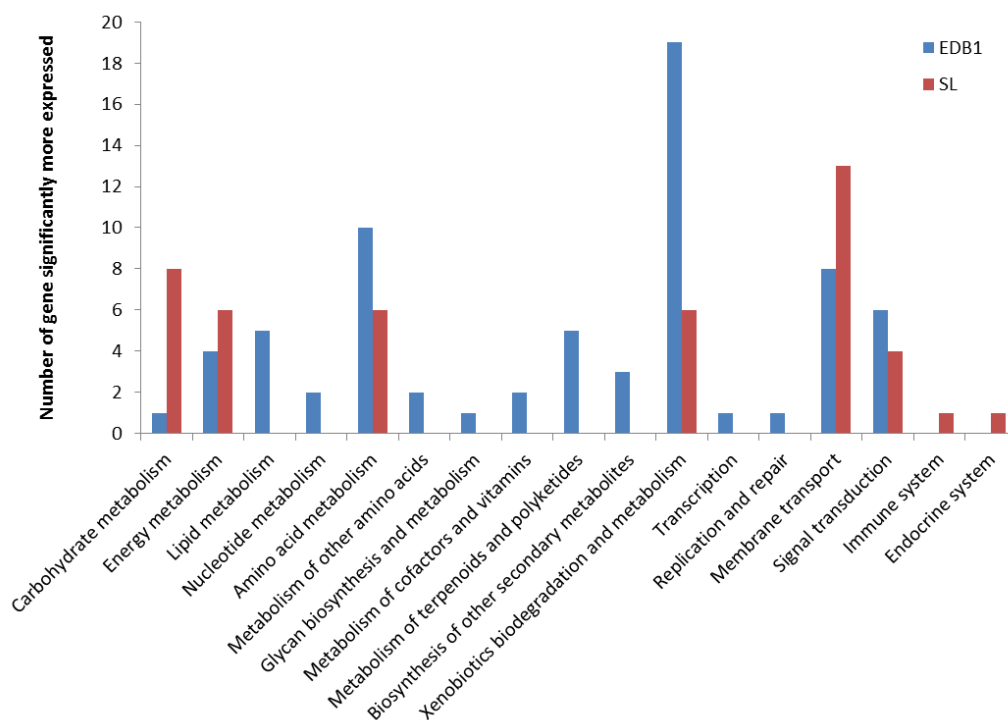


Figure III-9 : Number of genes significantly more expressed in the mats, grouped according to the kegg pathways (padj<0,1)

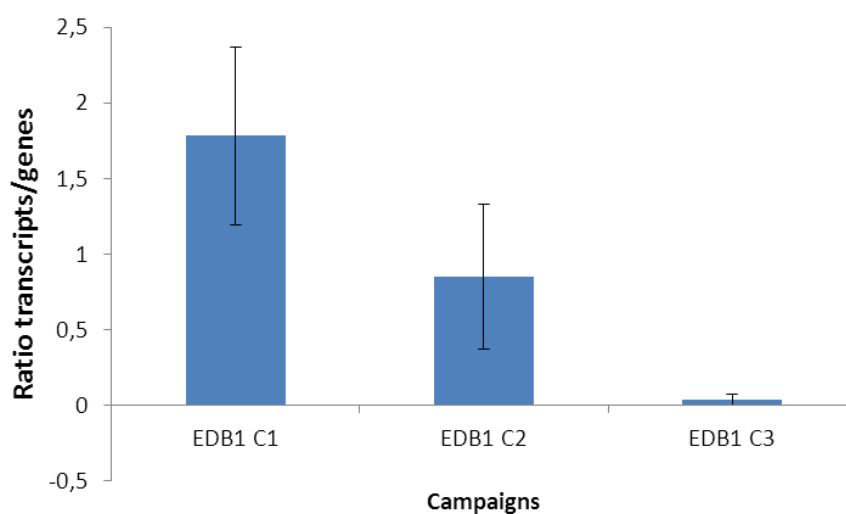


Figure III-10: Expression level of genes involved in hydrocarbon degradation (aromatics and alkanes) in EDB1 sites. The figure presents exclusively the genes showing significantly higher activities in contaminated site compared to the pristine site

The differential gene expression analysis between seasons was also performed. Among energy metabolism pathways, autumn campaigns showed higher abundance of transcripts related to photosynthesis - antenna proteins, including the phycoerythrin-associated linker protein and the bilin biosynthesis PecE protein from Cyanobacteria. Spring

campaign showed three genes involved in the methane metabolism pathway having higher abundance of transcripts. Genes involved in oxidative phosphorylation were significantly more expressed depending on seasons. In spring, the NADH dehydrogenase were more expressed whereas the cytochrome c oxidase were more expressed in autumn (Figure III-11).

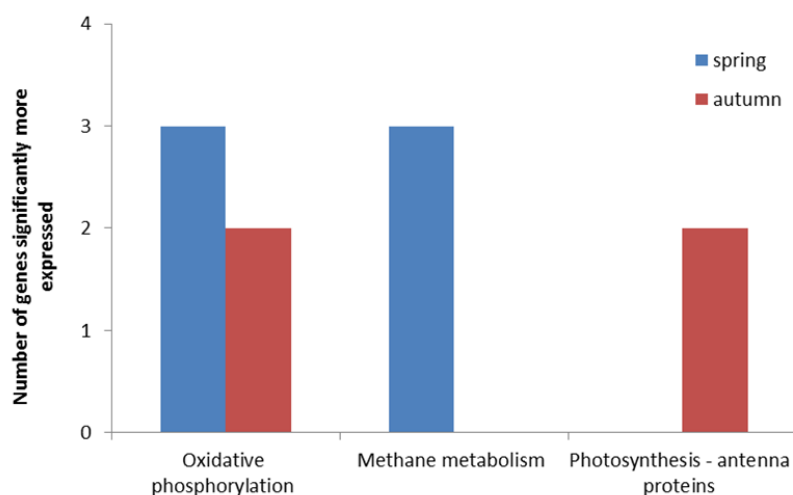


Figure III-11 : Gene significantly more expressed ($\text{padj} < 0,1$) among spring and autumn seasons through the energy metabolism pathway.

2.4. Discussion

Microbial mats are highly diverse microbial communities that have been observed developing in oil polluted areas. Most of the previous studies focus on the capacity of petroleum remediation of microbial mats in the polluted areas or *in vitro*, and this question is still under debate (de Oteyza *et al.*, 2006). In this paper we investigated the impact of petroleum in microbial mats structure and functioning. Previous studies investigated the impact of a punctual (accidental or in laboratory experiments) oil input on the community structure of the mats (Abed *et al.*, 2002; Barth, 2003; Bordenave *et al.*, 2007; Llirós *et al.*, 2008; Paisse *et al.*, 2010) or on the genes involved in hydrocarbon degradation (Bordenave *et al.*, 2008; Paisse *et al.*, 2010). But few studies examined the impact of oil contamination *in situ* and with long term pollution (Paissé *et al.*, 2008). Here we describe the bacterial and archaeal communities of two mats located on the Berre lagoon, with close physical-chemical parameters, but contrasted in their hydrocarbon contamination levels. The contaminated mat receives hydrocarbon inputs from the petrochemical industry installed for more than 80 years. Besides the description of the communities' diversity, we performed a deep description of the main metabolisms driving the functioning of the mats and, specifically, of those involved in hydrocarbon degradation in order to assess the role of the petroleum pollution in the microbial

community structure and functioning. Characterization was performed at different seasons in order to evaluate the impact of petroleum related to other natural, changing, environmental factors.

Both mats showed similar bacterial and archaeal structures observed in other mats, dominated by the *Proteobacteria*, the *Cyanobacteria* and, the *Bacteroidetes* (Bolhuis & Stal, 2011; Severin *et al.*, 2010) and by methanogens related to *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota* (Bolhuis & Stal, 2011; Robertson *et al.*, 2009). Sequences affiliated to the uncultivated *Parvarchaeota* phylum (Rinke *et al.*, 2013) was also dominant. These sequences belong to the ARMAN (Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms) which are ultrasmall cells without cultivated representatives. This lineage has been described from an acidic ecosystem through metagenomics studies and is still poorly described from an ecological perspective (Baker *et al.*, 2010). This newly described phylum could have an important role into archaeal community in microbial mats. The high diversity observed in both mats supports the assessment that microbial mats are among the most diverse marine ecosystems (Allen *et al.*, 2009; Bolhuis & Stal, 2011).

Although the community structure at the phyla level were the same, and although the common OTUs to both mats were highly dominant, a clear discrimination between mats could be observed. The differences concern the relative abundance of dominant OTUs and the rare or minor species. However, both mats showed extremely similar metabolic structures, suggesting metabolic redundancy. This redundancy was clearly demonstrated within the *Cyanobacteria* group that showed different dominant OTUs depending on sites and on seasons.

However, main differences could be observed at the transcriptomic level. Significantly, the contaminated site evolved differently than the not contaminated site: an increase of *Cyanobacteria* transcripts over time was observed for the contaminated site, suggesting a linear evolution; but a cyclic modification was observed in the uncontaminated site, with bacterial related to sulfur cycle in spring and *Cyanobacteria* in autumn.

The main physical and chemical difference among sites was the hydrocarbon contents, that affected the bacterial and archaeal community's structure, as previously described (Paissé *et al.*, 2008). Some oil degrading bacteria such as *Cycloclasticus* sp. (Dyksterhouse *et al.*, 1995) were found more abundant and active in the contaminated site. However, those hydrocarbonoclastic bacteria represented a minor part of the active community, as previously

observed in this mat (Hernandez-Raquet *et al.*, 2006; Paissé *et al.*, 2008). Despite the similar metabolic structure of the uncontaminated and contaminated mats, and the low abundance of already known hydrocarbonoclastic bacteria in the contaminated mat, mat seems to have a role in hydrocarbon degradation, since the genes involved in their degradation were significantly more express in the contaminated site than in the pristine site.

The hydrocarbon composition of the oil in the contaminated site changed over time with a higher concentration of branched PAHs and heavy weight hydrocarbon molecules in the last campaign, suggesting a biodegradation of the easier degradable hydrocarbons (n-alkane and PAHs with low numbers of rings, Atlas, 1981). In September 2009, an accidental oil spill occurred due to overflow of the hydrocarbon polluted water retention pond (Beau Monvoisin & LyonDellBasell, 2009) increasing the hydrocarbon contents. Hydrocarbon degradation occurring over the three campaigns may be linked to this punctual oil input, and allows to increasing the relative importance of PAHs in the mats, to attain the levels classically observed in this site (Paissé *et al.*, 2008). Moreover, the expression rates of genes involved in hydrocarbon degradation decreased over the campaigns, which could be linked to the reduction of the biodegradable petroleum. These results support the hypothesis that the microbial mats in the contaminated site, although having a similar metabolic structure than other equivalent not contaminated mats, is adapted to the hydrocarbon contamination and is able to cope with novel contamination expressing specifically the genes involved in degradation.

While hydrocarbon content was the main parameter affecting the structure and functioning of the mats, seasonal variations could also be noticed. This seasonality was already suggested by a year monitoring on an annual microbial mat (Bolhuis & Stal, 2011), but this is the first study monitoring the structure of a microbial mats community over two years. At the functional level, particularly on SL, structure of the metagenome and metatranscriptome followed seasonal variation. In pristine site, organisms related to the sulfur cycle were more abundant and more active in spring: the sulphate-reducing bacteria affiliated to the *Desulfobacterales* and the sulfur-oxidizing bacteria affiliated to the *Chromatiaceae*. Autumn campaign showed dominance of oxygenic photosynthetic organisms such as *Phormidiaceae*, and as consequence, genes involved in photosynthesis were significantly more active in autumn. Archaeal community showed seasonal variation within both sites, methanogen community were more abundant and more active in spring as well as the genes involved in methane metabolism. The seasonality of bacterial community in the contaminated

site EDB1 was less marked since the last campaign mat was divergent. Nevertheless, higher abundances and activities of sulfur-oxidizing bacteria were as well observed in spring campaigns. An increase of Cyanobacteria related transcripts over the campaigns were observed showing possible evolution of the community or a recovery after accidental oil spill. Petroleum evolution linked to bacteria metabolism could induce a modification of the structure of the microbial community explaining the lower seasonal variations on this site.

In conclusion, minor perturbation occurred in metabolic structure of a long term hydrocarbon polluted microbial mat; bacteria and metabolic genes involved in hydrocarbon degradation represented a minor part of the microbial community. Despite these minors change the contaminated site showed an evolution of the hydrocarbon composition with the loss of the easiest degradable hydrocarbons. Beside, a seasonal variation occurring; phototrophic community being dominant in autumn particularly on the pristine site while sulfur cycle and methanogenic part of the community were dominant in spring.

2.5. References

- Abed RMM, Safi NMD, Koster J, de Beer D, El-Nahhal Y, Rullkotter J, et al. (2002). Microbial Diversity of a Heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of Petroleum Compounds. *Appl Environ Microbiol* 68:1674–1683.
- Allen MA, Goh F, Burns BP, Neilan BA. (2009). Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity of smooth and pustular microbial mat communities in the hypersaline lagoon of Shark Bay. *Geobiology* 7:82–96.
- Anders S, Huber W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 11:R106.
- Atlas RM. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* 45:180–209.
- Barth HJ. (2003). The influence of cyanobacteria on oil polluted intertidal soils at the Saudi Arabian Gulf shores. *Mar Pollut Bull* 46:1245–1252.
- Beau Monvoisin N, LyonDellBasell. (2009). Déversement accidentel d'hydrocarbures, sur l'étang de Berre suite à un débordement des bassins d'orage de la Compagnie Pétrochimique de Berre (CPB). http://www.cedre.fr/pmb/opac_css/index.php?lvl=notice_display&id=3115.
- Benthien M, Wieland A, de Oteyza TG, Grimalt JO, Kühl M. (2004). Oil-contamination effects on a hypersaline microbial mat community (Camargue, France) as studied with microsensors and geochemical analysis. *Ophelia* 58:135–150.
- Bolhuis H, Stal LJ. (2011). Analysis of bacterial and archaeal diversity in coastal microbial mats using massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *ISME J* 5:1701–1712.
- Bonin PC, Michotey VD. (2006). Nitrogen budget in a microbial mat in the Camargue (southern France). *Mar Ecol Prog Ser* 322:75–84.

- Bordenave S, Goni-Urriza MS, Caumette P, Duran R. (2007). Effects of Heavy Fuel Oil on the Bacterial Community Structure of a Pristine Microbial Mat. *Appl Environ Microbiol* 73:6089–6097.
- Bordenave S, Goñi-urriza M, Vilette C, Blanchard S, Caumette P, Duran R. (2008). Diversity of ring-hydroxylating dioxygenases in pristine and oil contaminated microbial mats at genomic and transcriptomic levels. *Environmental Microbiology* 10:3201–3211.
- Coman C, Drugă B, Hegedus A, Sicora C, Dragoș N. (2013). Archaeal and bacterial diversity in two hot spring microbial mats from a geothermal region in Romania. *Extremophiles* 17:523–534.
- Dillon JG, Miller S, Bebout B, Hullar M, Pinel N, Stahl DA. (2009). Spatial and temporal variability in a stratified hypersaline microbial mat community. *FEMS Microbiology Ecology* 68:46–58.
- Dyksterhouse SE, Gray JP, Herwig RP, Lara JC, Staley JT. (1995). *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int J Syst Bacteriol* 45:116–123.
- Etcheber H, Relexans J-C, Beliard M, Weber O, Buscail R, Heussner S. (1999). Distribution and quality of sedimentary organic matter on the Aquitanian margin (Bay of Biscay). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 46:2249–2288.
- Frith MC, Hamada M, Horton P. (2010). Parameters for accurate genome alignment. *BMC Bioinformatics* 11:80.
- Garcia de Oteyza T, Grimalt JO. (2006). GC and GC–MS characterization of crude oil transformation in sediments and microbial mat samples after the 1991 oil spill in the Saudi Arabian Gulf coast. *Environmental Pollution* 139:523–531.
- Van Gemerden H. (1993). Microbial mats: a joint venture. *Marine Geology* 113:3–25.
- Hernandez-Raquet G, Budzinski H, Caumette P, Dabert P, Le Ménach K, Muyzer G, et al. (2006). Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the Etang de Berre (France). *FEMS Microbiol Ecol* 58:550–562.
- Ihaka R, Gentleman R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5:299–314.
- Lê S, Rennes A, Josse J, Rennes A, Husson F, Rennes A. (2008). FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* 1–18.
- Llirós M, Gaju N, de Oteyza TG, Grimalt JO, Esteve I, Martínez-Alonso M. (2008). Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. II. The changes in microbial species. *Sci Total Environ* 393:39–49.
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* 35:W182–185.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O’Hara R, et al. (2013). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-8.
- Paissé S, Coulon F, Goñi-Urriza M, Peperzak L, McGenity TJ, Duran R. (2008). Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 66:295–305.
- Paisse S, Goni-Urriza M, Coulon F, Duran R. (2010). How a Bacterial Community Originating from a Contaminated Coastal Sediment Responds to an Oil Input. *Microb Ecol* 60:394–405.

- Paissé S, Goñi-Urriza M, Stadler T, Budzinski H, Duran R. (2012). Ring-hydroxylating dioxygenase (RHD) expression in a microbial community during the early response to oil pollution. *FEMS Microbiol Ecol* 80:77–86.
- Pastor L, Deflandre B, Viollier E, Cathalot C, Metzger E, Rabouille C, et al. (2011). Influence of the organic matter composition on benthic oxygen demand in the Rhône River prodelta (NW Mediterranean Sea). *Continental Shelf Research* 31:1008–1019.
- Pringault O, Aubé J, Bouchez O, Klopp C, Mariette J, Escudé F, et al. (submitted). Contrasted effects of natural complex mixtures of PAHs and metals on oxygen cycle in a microbial mat. *Chemosphere*.
- Raghukumar C, Vipparthy V, David JJ, Chandramohan D. (2001). Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:433–436.
- Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng J-F, et al. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499:431–437.
- Ritalahti KM, Amos BK, Sung Y, Wu Q, Koenigsberg SS, Löffler FE. (2006). Quantitative PCR Targeting 16S rRNA and Reductive Dehalogenase Genes Simultaneously Monitors Multiple Dehalococoides Strains. *Appl Environ Microbiol* 72:2765–2774.
- Robertson CE, Spear JR, Harris JK, Pace NR. (2009). Diversity and Stratification of Archaea in a Hypersaline Microbial Mat. *Appl Environ Microbiol* 75:1801–1810.
- Roeselers G, Norris TB, Castenholz RW, Rysgaard S, Glud RN, Kühl M, et al. (2007). Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). *Environ Microbiol* 9:26–38.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541.
- Schneider D, Arp G, Reimer A, Reitner J, Daniel R. (2013). Phylogenetic Analysis of a Microbialite-Forming Microbial Mat from a Hypersaline Lake of the Kiritimati Atoll, Central Pacific. *PLoS ONE* 8:e66662.
- Severin I, Acinas SG, Stal LJ. (2010). Diversity of nitrogen-fixing bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol Ecol* 73:514–525.
- Severin I, Stal LJ. (2010). Diazotrophic Microbial Mats. In: *Microbial Mats*, Seckbach, J & Oren, A (eds) Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, Springer Netherlands, pp. 321–339.
- Takai K, Horikoshi K. (2000). Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. *Appl Environ Microbiol* 66:5066–5072.
- Vincent WF. (2002). Cyanobacterial Dominance in the Polar Regions. In: *The Ecology of Cyanobacteria*, Whitton, BA & Potts, M (eds), Springer Netherlands, pp. 321–340.

3. CONCLUSION DU CHAPITRE

La structure et le métabolisme des communautés microbiennes de deux tapis présentant des contaminations contrastées en hydrocarbures ont été examinés par des techniques moléculaires basées sur le gène codant pour l'ARNr16S et par des méthodes de séquençage systématique du métagénome et du métatranscriptome.

Cette étude menée sur deux saisons au cours de deux années, a montré que la séparation spatiale des échantillons prévalait sur la variation temporelle. Bien que les deux sites présentent une dominance de *Gamma-*, *Deltaproteobacteria* et de *Cyanobacteria* il a été observé que la contamination en hydrocarbures influence la structure et l'activité des communautés. Malgré ces structures de communautés différentes, des profils métaboliques très semblables sont observables, avec des fonctions similaires laissant supposer une redondance fonctionnelle. Le site contaminé présente par ailleurs des gènes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures significativement plus actifs que le site non contaminé. L'activité de dégradation n'est cependant pas le métabolisme dominant au sein des tapis, des bactéries caractérisées pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures sont plus abondantes et plus actives sur le tapis contaminé mais représentent une faible portion de la communauté. De plus, une évolution de la communauté du site contaminé semble apparaître, avec une diminution de l'activité des gènes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures en parallèle d'une modification de la composition des hydrocarbures, la teneur en hydrocarbures plus facilement dégradables diminuant au cours du temps.

En plus de la séparation spatiale, une séparation saisonnière semble être observée sur les sites, elle est cependant moins marquée pour le site contaminé. En automne, une dominance des cyanobactéries apparaît avec une plus forte activité de gènes impliqués dans la photosynthèse alors qu'au printemps une plus forte activité et abondance de microorganismes liés au cycle du soufre et du méthane sont observées, ainsi qu'une activité significativement plus importante des gènes impliqués dans le métabolisme du méthane. La dominance des organismes impliqués dans le cycle du soufre et leur fluctuation saisonnière nous a amené à étudier plus en détail le cycle sur soufre, sujet du prochain chapitre.

- CHAPITRE IV -

**STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DES
MICROORGANISMES IMPLIQUES DANS LE
CYCLE DU SOUFRE**

CHAPITRE IV : STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DES MICROORGANISMES IMPLIQUES DANS LE CYCLE DU SOUFRE AU SEIN DES TAPIS MICROBIENS

1. INTRODUCTION

Les travaux présentés dans le chapitre III ont permis d'appréhender la structure des deux tapis microbiens et ont mis en évidence une évolution de la composition des hydrocarbures en parallèle de celle de la communauté dans le tapis contaminé. Ils ont également permis de confirmer le rôle important du cycle du soufre dans ces tapis et ont montré qu'une fraction importante de la communauté bactérienne était phylogénétiquement affiliée aux *Desulfobacterales*, des bactéries sulfato-réductrices. Par ailleurs, il a été observé une activité des gènes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures au sein du tapis contaminé. Parmi eux des gènes de dégradation anaérobie ont été mis en évidence, comme la voie de dégradation anaérobie du toluène utilisant la benzylsuccinate synthase, suggérant que les communautés de sulfato réducteurs pourraient être impliquées dans la dégradation des hydrocarbures.

Afin d'approfondir les connaissances acquises sur ces tapis microbiens, nous avons cherché à cibler les communautés impliquées dans la transformation des espèces soufrés, étant donné que le soufre est prépondérant en milieu marin. La première partie du chapitre VI vise à apporter une vision globale du cycle du soufre, des microorganismes impliqués et de leurs métabolismes principaux. Cette étude est réalisée au travers de marqueurs fonctionnels et basée sur des techniques de PCR afin de cibler des groupes métaboliques spécifiques mais également au travers d'étude du métagénome et du métatranscriptome afin de s'affranchir des biais de la PCR et d'avoir une description des communautés actives au sein des tapis microbiens.

La deuxième partie cible un groupe métabolique particulier, celui des sulfato-réducteur, au travers de différentes méthodes moléculaires et culturales afin de comprendre leur fonctionnement au sein des tapis et leur rôle dans la dégradation des hydrocarbures. Etant donné que la lumière est l'un des principaux paramètres conducteur au sein des tapis microbien, l'activité des sulfato-réducteur a été examinée à la fois pendant la journée et pendant la nuit.

2. VARIATIONS SAISONNIERES DES POPULATIONS MICROBIENNES DU CYCLE DU SOUFRE AU SEIN DES TAPIS MICROBIENS LOCALISÉS SUR DEUX STATIONS DE L'ETANG DE BERRE

Ce travail est présenté sous la forme d'un article en préparation qui sera soumis pour publication sous le titre :

Seasonal variation of microbial sulfur cycle populations in two microbial mats from a brackish lagoon (Berre, France)

Par: Johanne Aubé, Pavel Senin, Frederic Escudié, Jérôme Mariette, Céline Jeziorki, Sophie Valière, Noëlle Bru, Edurne Biritxinaga-Etchart, Olivier Bouchez, Christophe Klopp, Rémy Guyoneaud, Marisol Goñi Urriza

2.1. Introduction

Sediments, and particularly microbial mats, are stratified according to various physical and chemical parameters. Among them, the oxidation degree of sulfur compounds plays a key role in coastal sediment structuring (Jørgensen, 1982). Since the oxidation state of sulfur may vary between -2 (as in sulfide) and + 6 (as in sulfate), different sulfur species can act as electron donors or acceptors for microorganisms (van Gemerden, 1993). Dissimilatory sulfate reduction which transformed sulfate to sulfur and sulfide occurs under anoxic conditions. It is mediated by sulfate reducing prokaryotes (SRP) which have been found within five taxonomical groups in bacteria and two in archaeal organisms (Muyzer & Stams, 2008). Sulfate is used as electron acceptor in anaerobic respiration, the key enzymes being the sulfate adenylyltransferase (Sat), the adenosine-5'-phosphosulfate reductase (AprAB) and the dissimilatory sulfite reductase (DsrAB). In turn, sulfur compounds oxidation is mediated by sulfur-oxidizing prokaryotes (SOP) under oxic and anoxic conditions. Different metabolic pathways may be involved; the reverse dissimilatory sulfate reduction (Hipp *et al.*, 1997), the sulfur oxidation mediated by the sulfur-oxidizing multi-enzyme Sox system, exclusively found in bacteria (Friedrich *et al.*, 2005) and, the sulfide-quinone oxidoreductase, present in a wide variety of prokaryotes (Pham *et al.*, 2008). The fully functional Sox complex is composed by SoxB, SoxXA, SoxYZ and SoxCD. SoxB have a hydrolytic function and, in previous studies, the SoxB-encoding gene has been used as a marker (Meyer *et al.*, 2007; Petri *et al.*, 2001). Aerobic sulfur compounds oxidation in *Archaea* is restricted to members of the thermoacidophilic *Sulfolobales*. In the domain Bacteria, sulfur compounds are oxidized by

facultative aerobic chemotrophic and anaerobic phototrophic bacteria (Friedrich *et al.*, 2005) affiliated to the α -, β -, γ - and ϵ -*Proteobacteria*, the *Chlorobia* and the *Chloroflexi* (Ghosh & Dam, 2009).

Sulfur cycle is closely linked to carbon fixation through chemosynthesis and photosynthesis. Many Anoxygenic Phototrophs are involved in sulfur compound oxidation. Among them, the Purple Sulfur Bacteria (PSB), dominant in shallow sediments use the sulfide as main electron donor, whereas the Purple Non Sulfur Bacteria (PNSB) and Aerobic Anoxygenic Phototrophs (AAP), are mainly heterotrophs, but can grow photolithotrophically (Friedrich *et al.*, 2005), leading to the sulfur compound oxidation. To target this phylogenetically diverse groups, the *pufM* gene belonging to the photosynthetic gene cluster, has been frequently used as a marker in the investigation of their diversity (Béjà *et al.*, 2002; Ferrera *et al.*, 2013; Koh *et al.*, 2011 refs PSB et PNSB).

In this study, we determined the structure, activity and seasonal variations of the sulfur cycle related prokaryotes in two microbial mats, located in the Berre lagoon, and contrasted by their hydrocarbon contamination. Diversity and abundance of SOP and SRP were extensively studied using four functional markers: *dsrB* that targets SRP, *aprA* that targets both SRP and SOP, *soxB* that targets sulfur-oxidizing multienzyme system containing SOP, and *pufM* that targets, but not exclusively, both aerobic and anaerobic anoxygenic phototrophs SOP. These markers were studied through a PCR-based approach but also through systematic sequencing approach. Environmental parameters have been examined to infer the processes driving these communities' variations along four successive sampling in spring and fall 2011 and 2012.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Site description and sampling location

Samples were taken from microbial mats developing in the Berre lagoon near Marseille. Four sampling campaigns were realized, two in spring (April 2011 and 2012) and two in autumn (September 2011 and 2012) named respectively C0 and C2 for April sampling and C1 and C3 for September sampling. Samplings were realized on two sites : Station EDB1 was located in a retention basin receiving hydrocarbon-charged wastewaters from a petrochemical industry and station SL was located on the bird reserve "Les salins du lion" near the Marseille Airport (Aubé *et al.*, submitted). The 2 first centimeters of the sediments

were collected from core samplers and immediately stored at -80°C until molecular analyses. Sediment samples for chemical analyses were realized as describe in (Aubé *et al.*, in prep).

2.2.2. Physical and chemical analyses

Hydrocarbon analyses in sediments were performed by the Cedre (Brest, France) using Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GCMS) as described by Stauffert *et al.*, (2013). Metals and transition metals (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Sn and Zn) were quantified via Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICPMS) by UT2A (Pau, France) as describe by Aubé *et al.* (Submitted). Sulfates and hydrogen sulfide were quantified with the method described in Kolmert *et al.*, (2000) and with the methylene blue method (Cline, 1969) respectively. Redox potential, pH, salinity and dissolved oxygen were measured *in situ* (pH/MVMETRE 340 from WTW, refractometre Atago S10 and electrode CelOX325 respectively). Total carbon (TC), total sulfur (TS), Organic Carbon (OC) and total nitrogen (TN) contents were measured as describe by Aubé *et al.*, (in prep)

2.2.3. DNA/RNA extraction and cDNA synthesis

To coextract RNA and DNA in triplicate, the RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation kit (MO BIO) was applied and coupled with the AllprepDNA/RNA mini kit and the RNase-Free DNase Set (QIAGEN). RNA qualities were checked using RNA nano chip on a Bioanalyzer 2100 (Agilent) and RNA Integrity Number (RIN) upper 7 were obtained. Absence of DNA contamination within RNA samples were determined by PCR amplification of RNA without reverse transcription step. cDNA synthesis were realized on RNA using M-MLV RT and RNase OUT™ (Invitrogen) with 1 µl of RNA extracts. Reverse transcription was performed for 2h at 42°C with random primers (1 µL at 5U/ml) according to manufacturer's instructions.

2.2.4. Quantification of genes and transcripts

dsrB, *aprA*, *pufM* and *soxB* genes and transcripts were quantified using the DyNAmo Flash SYBR Green qPCR kit (Thermo scientific) in a Mx 3005PTM (Stratagene) as described by Paissé *et al.*, (2012) using DSRp2060F and DSR4R primers for *dsrB* (Geets *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 1998), aps1F and aps4R primers for *aprA* (Meyer & Kuever, 2007), pufMF557 and pufMR750 primers for *pufM* (Béjà *et al.*, 2002) and soxB432F and soxB693B primers for *soxB* gene (Petri *et al.*, 2001). PCR products were cloned in the pCR2.1 Topo TA cloning kit (Invitrogen) to generate the standard curve for gene number quantification. For the transcripts quantification the standard curve was performed with the cDNA obtained after *in vitro*

transcription. The cloned PCR product were transcribed in vitro, using the Megascript® kit (Mobio) and reverse transcribed using the conditions described above in order to obtain cDNA for the standard curve of transcript quantification. Reactions were cycled as described by (Paissé *et al.*, 2012) with annealing temperatures of 54°C, 57°C, 51°C and 58°C for *dsrB*, *aprA*, *pufM* and *soxB* respectively for 30 s. Analysis was performed as described in (Paissé *et al.*, 2012). PCR efficiencies varied between 102.3% and 108.8% for the *dsrB*, *aprA* and *pufM* genes but those of *soxB* were of 69.8%. The correlation factors (r^2) were not lower than 0.997 in all reactions. Genes abundance between sites were compared using analysis of variance and Tukey's honest significant differences (HSD) tests with the MASS package (Ihaka and Gentleman, 1996) in the R software.

2.2.5. Genes and transcripts sequencing

To determine the sulfate reducing and the sulfur-oxidizing bacteria compositions the *DsrB*, *AprA*, *SoxB*, *PufM* genes and transcripts were amplified with primers used for quantitative PCR containing the adapters CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT and GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT for forward and reverse primers respectively. The PCR conditions were the same as for qPCR, except for the initial denaturation and final extensions which were of 5 min at 94°C and 72°C respectively. Amplicons were sequenced using the MiSeq 250-paired-ended technology (Illumina) as described by Aubé *et al.*, (submitted).

2.2.6. Bioinformatics analyses

We have used the ng6 NGS platform (Mariette *et al.*, 2012) genefunc pipeline to process the data as describe by Aubé *et al.*, (Submitted). Analyses were constructed from pairs with a minimum overlap of 80, 90, 180 and 190 nucleotides for *pufM*, *dsrB*, *aprA* and *soxB* sequences respectively. Curated sequences were clustered into operational taxonomic units using a cut-off of 91, 94 and 95% for *aprA*, *soxB* and *dsrB* respectively as defined by previous work (Colin *et al.*, 2013; Hügler *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2013). For *pufM* a threshold value of 93% for PufM amino acid sequences, consistent with the 94% threshold for nucleic sequences (Ferrera *et al.*, 2013), was chosen for the OTU definition. Taxonomic affiliation and translation step were processed using references databases constructed from NCBI. Database for PufM, DsrB, AprA and SoxB contained respectively 98, 250, 161 and 96 proteins sequences representing most of the known genera containing these genes. Amino acid sequences of the 500 most abundant OTU from PufM, SoxB and AprA (representing

more than 90% of sequences) were aligned by ClustalW with their respective databases (Larkin *et al.*, 2007). To obtain an accurate phylogenetic affiliation, a phylogenetic tree was constructed using the database of each gene and the 500 most abundant OTU for *aprA*, *pufM* and *soxB* as they represented more than 90% of the read abundance. Phylogenetic trees were constructed using the neighbour joining algorithm with 1000 bootstraps on Mega 5.05 software. For DsrB sequences were affiliated as described by Aubé *et al.*, (submitted).

2.2.7. Whole meta-genome and meta-transcriptome systematic sequencing and bioinformatics procedures

Genomic DNA libraries were constructed using the BioScientific PCR-free kit following the manufacturer's protocol. RNA-seq libraries were prepared according to Illumina's protocols on a Tecan EVO200 liquid handler using the IlluminaTruSeq Stranded mRNA sample prep kit to analyze RNA after mRNA enrichment using Epicentre RiboZero kit, as described by Aubé *et al.*, (submitted).

The Last aligner v392 (Frith *et al.*, 2010) was used to align all filtered reads (DNA and mRNA) to KEGG genes database. The single-directional best hit information method was used to annotate each read (Moriya *et al.*, 2007). From these alignments, we extracted the sequences of gene and transcripts aligned with the genes *aprA*, *dsrB*, *pufM* and *soxB* from the KEGG database. The resulting KEGG data were normalized by dividing the number of hits for each category by the total number of hits.

2.2.8. Statistical analysis

Analyses were realized in triplicate. For molecular analysis, we first performed a cluster analysis using Bray Curtis distances (Vegan package, R) (Oksanen *et al.*, 2013) using the OTUs tables as variables, in order to assess the homogeneity of the replicates. For all the analysis performed, the variability between replicates was much lower than between samples. Replicates were then gathered and 100 successive random samplings of communities with a size corresponding to the minimum of sequences per replicate were realized in order to obtain the maximum of the diversity from the samples (Aubé *et al.*, submitted). Further analyses were realized using these normalized data. Taxonomic richness and diversity estimators were calculated using the Mothur software package (Schloss *et al.*, 2009). Analysis of variance and Tukey's honest significant differences (HSD) tests were performed using the MASS package (Ihaka & Gentleman, 1996). Cluster analyses were performed using Bray Curtis distances

(Vegan package, R). We used CCA in R (Vegan package) to find the environmental parameters that best explained the diversity of our protein sequences.

2.3. Results

2.3.1. Quantification of functional genes

Quantification of sulfur-oxidizing and sulfate-reducing microorganisms was realized through *dsrB*, *aprA*, and *soxB* functional genes. No significant differences between sites or seasons could be observed in the abundance of the markers investigated (Figure IV-1). The *dsrB* and *aprA* markers were found linked; higher *dsrB* and *aprA* abundances were observed in samples EDB1C1 and SL C2. Abundance of sulfate-reducing organisms on EDB1 C3 was too low to allow a quantification of *dsrB* genes; concomitantly *aprA* abundances were found at least 100 times lower in this sample as compared to the other samples. This result suggested that the variations of the *aprA* abundances were related to the variations of the SRP populations part and not to the SOP populations. *pufM* gene, targeting the anoxygenic phototrophic bacteria, showed lower abundance on both sites during the campaign 0 in April ($p > 0.05$, TukeyHSD test).

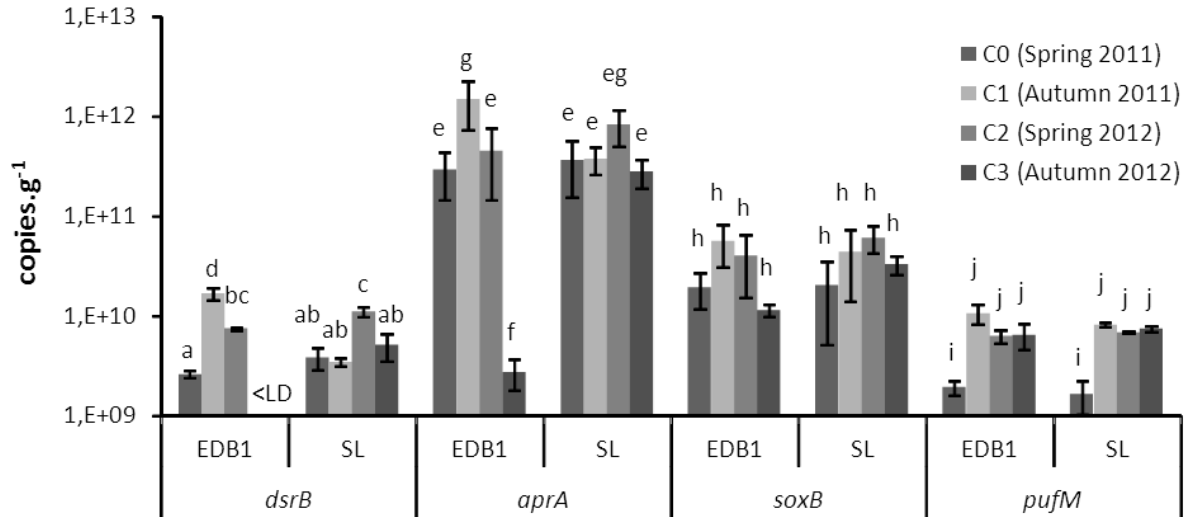


Figure IV-1 : Abundance of functional gene markers for sulfur cycle across four campaigns through PCR based methods. Identical letters above the bars indicate that the abundance or the expression were not significantly different according to a TukeyHSD test ($P < 0.05$) among each gene.

2.3.2. Diversity of sulfur cycle microorganisms through PCR based methods

A total of 5 588 679 high-quality sequences were obtained for all of the genes, with an average of 36 850 sequences per sample. SL site showed an overall diversity higher than that

found for EDB1 (Table IV-1). For both sites, higher diversity were observed in fall samples for anoxygenic microorganisms (*pufM*-gene diversity), and in spring samples for sulfate reducers (*dsrB*-gene diversity). EDB1 campaign 3 showed the lowest diversity for the *dsrB* and the *aprA* genes but the highest for *pufM* and *soxB*. These differences could be observed morphologically; the EDB1C3 mat being much more rigid and structured than the other sampled mats.

Table IV-1 : Observed prokaryotic diversity among sites through PCR based method. Sobs are the number of observed OTU for an OTU definition

Samples	Sampling time	Shannon index				Sobs			
		DsrB	AprA	SoxB	PufM	DsrB	AprA	SoxB	PufM
EDB1 C0	spring 2011	5,40	4,54	2,62	3,50	2130	2067	1569	2092
EDB1 C1	fall 2011	4,97	4,31	2,34	4,19	1667	1668	1138	2908
EDB1 C2	spring 2012	5,03	4,31	3,23	3,04	1205	1224	1098	2390
EDB1 C3	fall 2012	3,21	3,22	4,71	4,26	171	669	1223	2631
SL C0	spring 2011	5,55	4,75	3,51	3,64	2366	1623	1200	1844
SL C1	fall 2011	4,31	4,72	3,98	4,21	1392	1640	1266	3254
SL C2	spring 2012	4,79	4,48	4,05	3,82	1549	1437	1443	2458
SL C3	fall 2012	4,13	4,75	3,81	4,64	1209	2057	1758	4561

The main criterion clustering samples was the sample origin, except for *pufM* gene diversity. Within a site, a seasonal effect could be observed (Figure IV-2a), which was particularly true for SL mats. Seasonal variation within EDB1 was less pronounced because of the C3 campaign which was more divergent than the other samples.

In order to determine the environmental parameters affecting communities' structure, CCA analyses were performed for campaign C1 to C3 samples, since environmental data were lacking for the C0 campaign (Figure IV-3). Only sulfur species and organic carbon contents influenced significantly the communities (permutation tests, data not shown). Whatever the marker investigated, none community structure was significantly influenced by hydrocarbon content. CCA showed similar distribution of the samples, with EDB1 samples distributed along the sulfur species and organic carbon contents' positive axes, whereas SL samples were distributed in the negative axes defined by these two parameters. Finally, all the gene diversities were influenced by the organic carbon contents in sediments, but sulfate reducers were related to the sulfide overlaying water and SOP with the total sulfur contents in sediment.

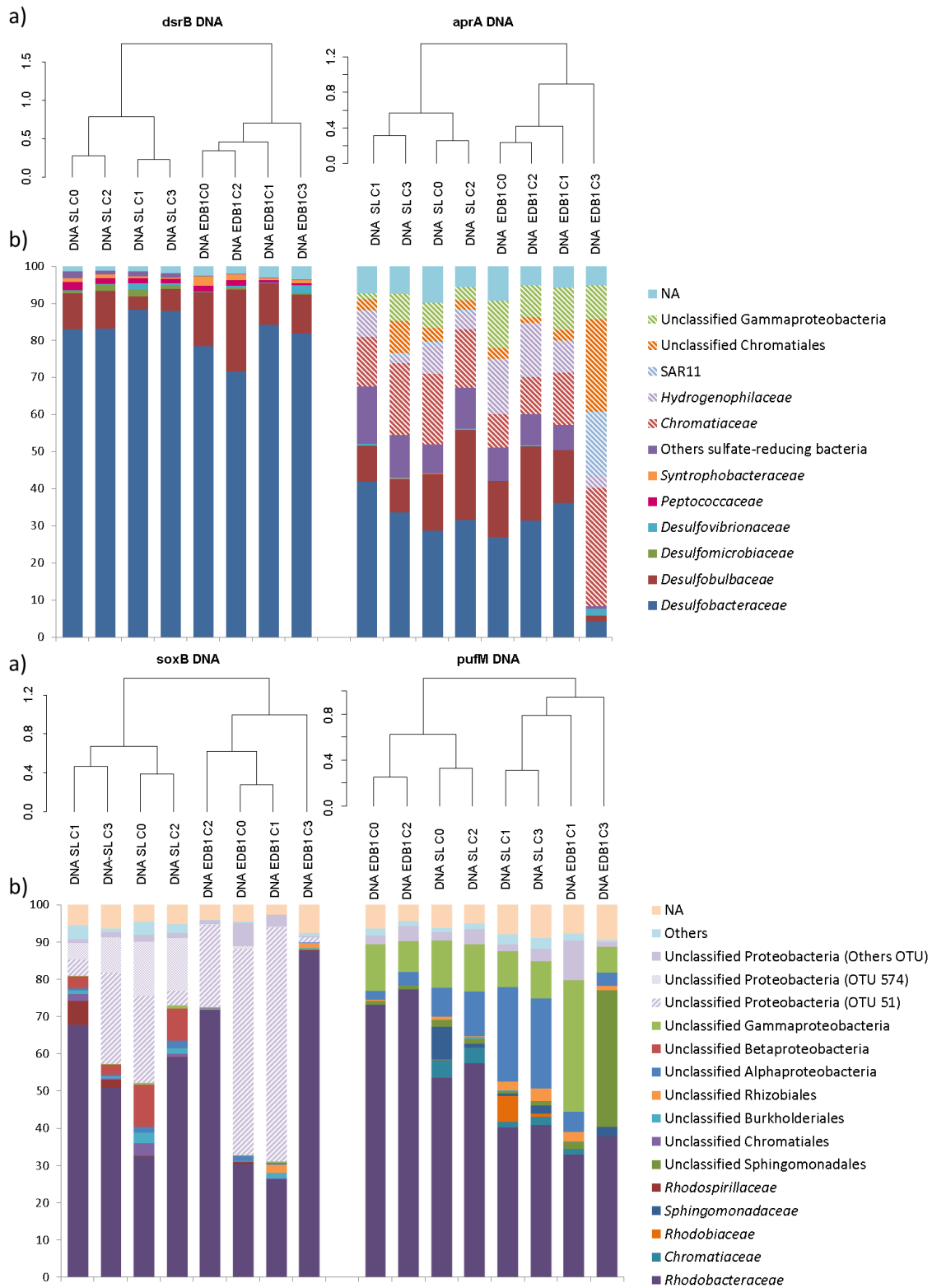


Figure IV-2 : Comparison of bacterial diversity among functional genes between the different sampling points through PCR based methods. (a) Cluster analysis of bacterial diversity using the Bray-Curtis dissimilarity. (b) Bar chart representing the relative abundance of the dominant families in the different stations. C0 and C2 were spring sampling whereas C1 and C3 were fall sampling.

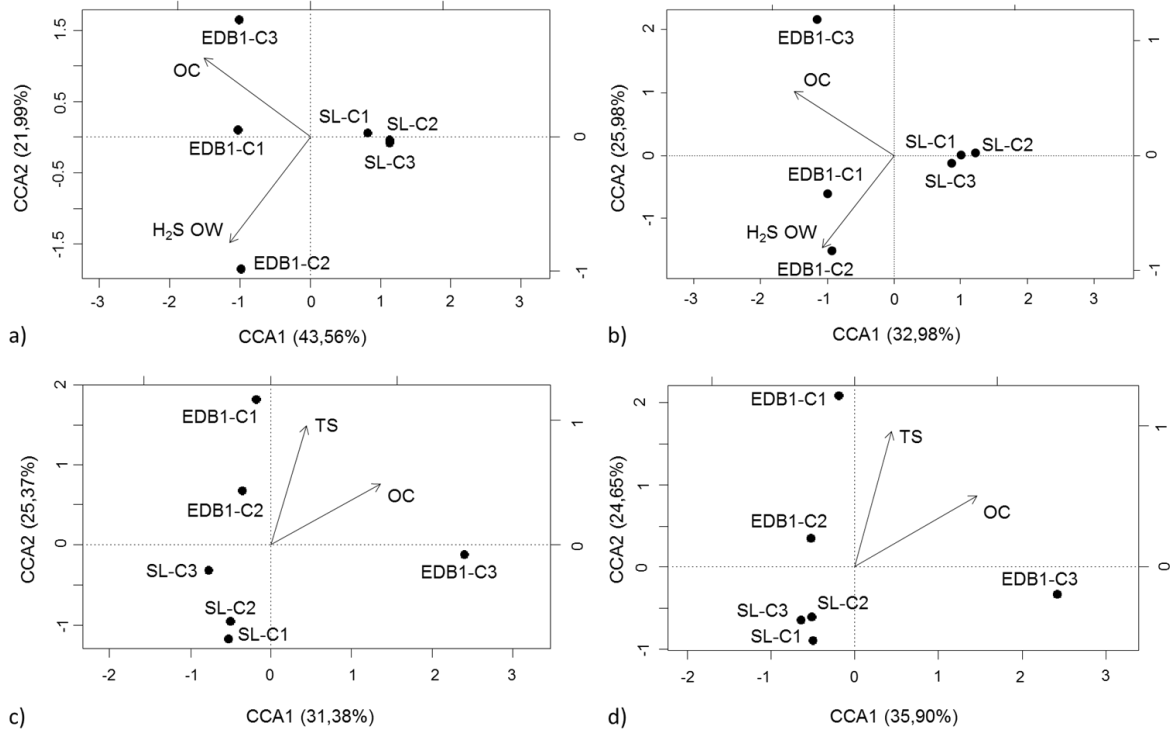


Figure IV-3: CCA realized on campaign C1, C2 and C3 between the bacterial communities of each station and the significant environmental parameters. The bacterial community structure is represented using OTU tables of the genes *dsrB* (a), *aprA* (b), *soxB* (c), and *pufM* (d). Abbreviations are: TS, Total Sulfur; OC, Organic Carbon; H₂S OW, Sulfide Overlaying Water.

On the basis of the phylogenetic analysis, histograms were constructed at the family level. *aprA* based diversity leads to the characterization of SRP and some SOP. *aprA* reads were dominated by sulfate reducer ranging from 51.1% to 67.6% of the sequences except for the site EDB1 at the campaign 3, with particular low proportions of SRP in agreement with quantification data. Conversely proportion of sulfur oxidizing bacteria increased mainly due to SAR11 clade related reads.

Sulfate reducing bacteria were dominated by the *Desulfobacteraceae* and the *Desulfobulbaceae*, whatever the *aprA* or *dsrB* genes analyzed. Proportion of *Desulfobulbaceae* related reads increased in spring samples. OTUs 148 and 187 (Figure IV-2) accounted for an average of 2.09% and 0.14% of the total of reads in autumn campaigns to 5.71% and 4.47% of the total reads for spring campaigns respectively. The closest cultured relatives were *Desulfobulbus elongatus* with 92 and 91% of identity. The *Desulfarculaceae*, the *Desulfovibrionaceae*, the *Peptococcaceae* and the *Nitrospiraceae* sulfate reducer sequences were also present but in a lesser extent. In spite of lower abundances of the sulfate-reducing bacteria in EDB1 C3 sample, the community structure stayed close to those of other

campaigns, with the dominance of the *Desulfobacteraceae* related sequences. However a higher proportion of the *Desulfovibrionaceae* affiliated sequences could be observed. Congruent phylogenetic distribution for sulfate reducer was obtained with the *dsrB* marker. Sequences were mainly affiliated to the *Desulfobacteraceae* and *Desulfobulbaceae* families, with an increase of the relative abundance of the *Desulfobulbaceae* related sequences in spring campaigns. Conserved phylogeny and an extensive database for the DsrB sequences both allowed a better affiliation at the genera level. Sequences affiliated to the *Desulfotignum*, *Desulfococcus* and *Desulfobulbus* genera were dominant. Proportion of OTU 3058 affiliated to *Desulfobulbus* increased during spring campaigns (0.01% to 3.33% on average).

Three markers were used to characterize the SOP community because of the different metabolisms involved and their phylogenetic diversity. Among sulfur-oxidizing bacteria described with *aprA*, the *Gamma* and *Betaproteobacteria* related sequences dominated, with the *Chromatiaceae* and the *Hydrogenophilaceae*. OTU 4613 affiliated to the *Halochromatium* genus (94.6% of identity) within the *Chromatiaceae* family were the most abundant OTU at both sites. The *Chromatiaceae* were represented as well by the OTU 97 affiliated to the *Thiocystis* genus (91.60% of identity). *Hydrogenophilaceae* family, mainly represented by the OTU 167, was more abundant in EBD1, the closest relative being affiliated to the *Thiobacillus* genus with 90.23% of identity. The *Alphaproteobacteria* affiliated sequences were specifically abundant on EDB1 C3 represented by the SAR11 clade.

The taxonomic affiliations of *soxB* and *pufM* sequences are limited since, they don't allow a good affiliation of their relatives sequences, restraining the description of the SOP diversity. Between 9.2 to 68.9% of the *soxB* sequences were classified as non-affiliated or *Proteobacteria*. Among these, the OTU51 and 574 were dominant and accounted up to 62.89% and 14.58% of the reads, respectively. They shared 81.2% of similarity between each other, whereas their closest relatives were affiliated respectively with *Thiobacillus denitrificans* (77% similarity) and with *Thiothrix nivea* (78% similarity) from two different classes. The sequences that could be affiliated were related to the *Rhodobacteraceae* family within the *Alphaproteobacteria*. All these sequences prevailed in both sites, but OTU663, an unclassified *Betaproteobacteria*, was particularly abundant in the SL site. The sequences obtained from this site present as well an important proportion of *Rhodospirillaceae* related sequences in the September samples.

The seasonal variation in the *pufM* diversity was more pronounced than those observed for the others markers. A higher abundance of the *Rhodobacteraceae* related OTUs

in spring campaigns was observed, increasing from 32.83 to 40.77% in autumn sampling to 53.45 to 77.13% in spring sampling. This increase was OTU-dependent and was mainly associated to the increase of OTU 0 and 17 in spring campaigns (respectively, 96.88 and 95.31% of identities to the *Rhodobacteraceae* bacterium HTCC2083). On the opposite, the OTU 22 related to *Roseobacter* sp BS90 (92.54% of similarity) increased from 3.40% to 14,76% in autumn on SL. Among sites, the main difference was the higher relative abundance of unclassified *Rhizobiales* affiliated sequences in EDB1 related to SL. EDB1 site presented on C3 high proportion of OTU 18; 54; and 56, related to *Roseateles depolymerans*, *Roseobacter denitrificans* OCh 114 and *Ahrensia* sp R2A130. Finally, 22.5 to 65.4% of the *pufM* sequences could not be affiliated to the family; EDB1 C3 samples presented particularly high proportion of unclassified *Sphingomonadales* related sequences.

2.3.3. Genes, expression and taxonomic description through systematic sequencing

Taxonomic affiliation was performed on gene and transcripts of functional markers obtained through systematic sequencing with the samples from the campaign C1 to C3. Relative abundance of the marker ranged from $1.96.10^{-4}$ % to $7.11.10^{-2}$ % of the total number of hits (Figure IV-4). Minimal values were attributed as previously found to genes related to sulfate reduction in EDB1 C3. As for quantitative PCR, *aprA* was the most abundant gene in the community, and particularly for C1 samples. Relative abundances of *dsrB* compared to those of *soxB* were different than those obtain through quantitative PCR, since EDB1 C1 showed higher abundances of *dsrB* than of *soxB*.

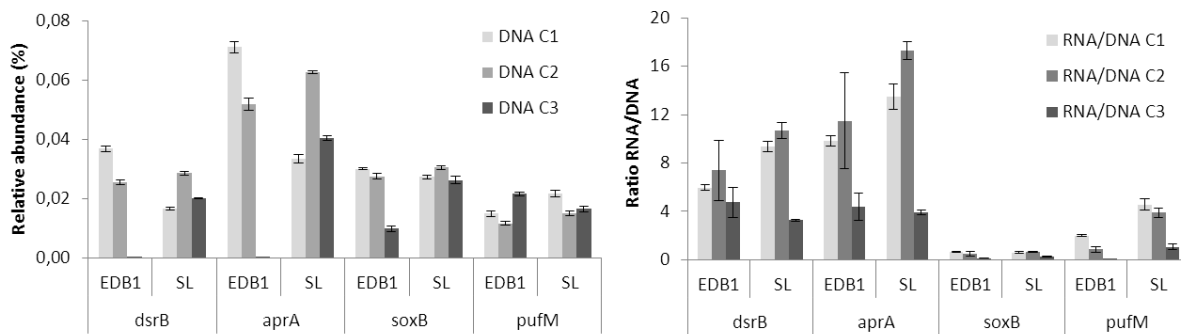


Figure IV-4: Relative abundance of the genes *aprA*, *dsrB*, *soxB* and *pufM* through systematic sequencing of the metagenome (a) and expression of the gene (b). Analyses were realized on campaign C1 and C3 (fall sampling) and C2 (spring sampling).

mRNA sequencing enable the investigation of expression of the four marker genes that couldn't be described by PCR techniques. Relative abundance of the transcripts ranged from

0.2 to 0.0006% of the hits, the minimum being observed for *pufM* and the maximum for *aprA* (data not shown). Ratios of expression were obtained by dividing the number of transcripts by the number of genes related reads. Genes related to sulfate reduction showed the highest expression rates and, C2 samples showed the maximum of expression for both sites. The minimum of expression was observed for the sulfur-oxidation gene *soxB*, with ratios lower than 1. The *pufM* expression rates exhibiting a decrease in the expression through the campaigns. Minimum of expression for the four genes were observed in the last campaign.

As for PCR sequencing, metagenomic systematic sequencing revealed the dominance of the *Desulfobacteraceae* but also high abundances of the *Desulfovibrionaceae* (15.97 to 26.63% of the *dsrB* sequences) and *Peptococcaceae*. The latter accounted for 5.77 to 7.05% of the *dsrB* sequences with the exception of the EDB1 C3 sample which didn't revealed sequences related to this family. Relative abundance of these families were lower than those detected by using the PCR based method. The active parts of the community exhibited similar patterns than those present with the dominance of the *Desulfobacteraceae* and the *Desulfobulbaceae* related transcripts, followed by the *Desulfovibrionaceae* and the *Peptococcaceae*. As for PCR based methods, higher abundances of gene sequences related to the *Desulfobulbaceae* in spring campaigns were observed and with a concomitant increase of transcripts. Sulfate-reducers accounted for 44.78 to 73.25% of the *aprA* gene, the minimum percentage was found for the EDB1 C3 sample that was nevertheless higher than the value observed using the PCR based method. As for *dsrB*, *aprA* related sulfate reducers were mainly affiliated to the *Desulfobacteraceae*. Sequences affiliated to the *Desulfococcus* and *Desulfatibacillum* genera were abundant and active when analyzing these two genes. The *Desulfovibrionaceae* related sequences represented high abundances in the last campaign of EDB1 as detected by PCR based methods. Transcripts related to sulfate reducers represented a higher proportion of *aprA* sequences accounting for 68.87 to 88.19% of the *aprA* transcripts, with the exception of EDB1 C3 sample for which they represented only 6.93% of the transcripts.

Sulfur oxidizing communities related to *aprA* revealed high abundances of sequences related to the *Chromatiaceae* and the *Hydrogenophylaceae* as found with PCR based method. They were dominant among sulfur oxidizing transcripts. As for PCR based method, SAR11 were as well specifically abundant on the last campaign of EDB1. Systematic sequencing allowed in addition the identification of the *Ectothiorhodospiraceae* and the *Gallionellaceae* related sequences.

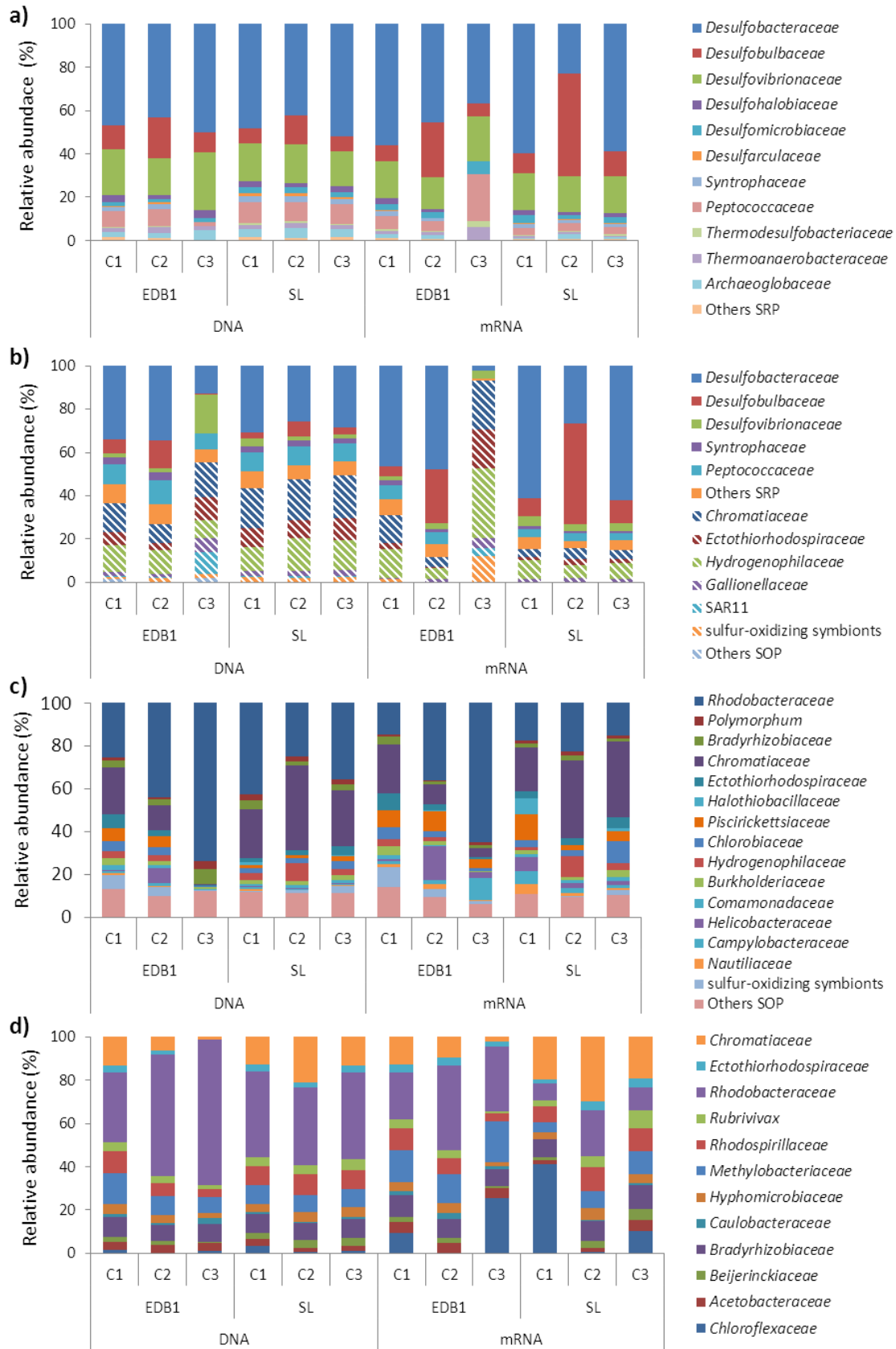


Figure IV-5: Taxonomic affiliation of the *dsrB* (a), *aprA* (b), *soxB* (c) and *pufM* (d) genes and transcripts at the family level through systematic sequencing. Analyses were realized on campaign C1 and C3 (fall sampling) and C2 (spring sampling).

The *Rhodobacteraceae* were the dominant family of the *soxB* related sequences. They were mainly affiliated to aerobic phototrophic bacteria such as *Roseobacter*, *Dinoroseobacter* and the Purple non sulfur Bacteria (i.e., *Rhodobacter spp.*). *SoxB* genes were as well related to anoxygenic purple sulfur bacteria (*Thiocystis*, *Allochromatium* and *Thioalkalivibrio*), green sulfur bacteria (*Chlorobium* and *Chlorobaculum*) and colourless sulfide-oxidizing bacteria (*Hydrogenophilaceae*, *Piscirickettsiaceae*, *Helicobacteraceae*, *Bradyrhizobium*). The *Rhodobacteraceae* related sequences represented a lower part of the active *soxB* community while colourless sulfide-oxidizing bacteria related sequences such as *Piscirickettsiaceae*, *Nitratifactor* and *Campylobacteraceae* were present at higher proportion in the metatranscriptome.

The *pufM* genes were mainly affiliated to the aerobic phototrophic bacteria from the *Roseobacter* clade within the *Rhodobacteraceae* family, as described when using PCR-based approaches. If anoxygenic purple sulfur bacteria represented less than 23% of the gene sequences, they represented higher part of transcripts, on the contrary *Roseobacter* clade were less expressed. The dominant genus within the metatranscriptome when considering the *pufM* transcripts was *Chloroflexus*.

2.4. Discussion

Coastal sediments and microbial mats contain high levels of sulfur compounds, and thus, microorganisms involved in the sulfur cycle are extremely active in such ecosystems (Jørgensen, 1982). Several studies have shown the extensive diversity inhabiting microbial mats (Bolhuis & Stal, 2011); however the structure of SOP and SRP have not been so deeply explored. Here we depicted the diversity of the sulfur-cycle-related functional groups in two distinct microbial mats. The relations between community's structures and seasonal variations and environmental conditions were investigated.

Four genes were employed to describe the diversity, activity and distribution of the SOP and SRP communities. Lower expressions were observed for sulfur oxidizing pathways than for sulfate-reducing pathway. As the anaerobic photolithotrophic and aerobic chemolithotrophic sulfide oxidation rates are more important than abiotic rates (Luther *et al.*, 2011), other metabolic pathways than those targeted in this study, such as the sulphide-quinone oxidoreductase or the flavocytochrome c (Frigaard & Dahl, 2008) may be involved in sulfide oxidation. In addition several species of cyanobacteria are known able to perform anoxygenic photosynthesis using H₂S as the electron donor (Cohen *et al.*, 1975; Miller &

Bebout, 2004). But the markers selected didn't allow depicting the possible implication of the cyanobacteria in sulfide oxidizing processes within microbial mat community despite their abundance at these sites (Aubé *et al.*, submitted). *pufM* functional marker target principally the purple phototrophic bacteria, it doesn't allow depicting the overall diversity of green sulfur bacteria which are also involved in sulfur cycle. These bacteria could be investigated by using the *fmo* gene as a marker, however, due to environmental conditions in shallow environments (light, variations in oxygen concentrations) these bacteria are present in low abundance in microbial mats dominated by PSB (van Gemerden, 1993; Jorgensen & Des Marais, 1986). The sulfide oxidation process is performed by a wide variety of microorganisms using different genetic determinants and reporting a complete picture of this process in an ecosystem is difficult. In this paper we analyze the dominant metabolisms involved in it.

Functional genes involved in sulfide oxidation (i.e. *soxB*, *aprA* and *pufM*) were related to *Alpha-Gamma-* and *Betaproteobacteria*. Their analysis allowed to evidence the abundance of phototrophic PSB affiliated to the *Chromatiaceae* and the *Ectothiorhodospiraceae* in both targeted pathways. Representatives of the *Thiocystis* genus were found abundant through both PCR-based and systematic sequencing techniques and the genus *Allochromatium* was observed with systematic sequencing. These bacteria are clustered in a phylogenetic group of primarily freshwater species, (Imhoff, 2008) and were detected in Berre lagoon samples by molecular (Ranchou-Peyruse *et al.*, 2004) and cultural approaches (Ranchou-Peyruse *et al.*, 2006). In contrast, the genus *Halochromatium* observed through PCR-based method was related to marine habitats. The presence of both marine and freshwater species was in accordance with the low salinity of the Berre lagoon (Zaghmouri *et al.*, 2013). Other *pufM* sequences as well as *soxB* sequences were mainly related to the *Rhodobacteraceae*. Among them, some microorganisms were described as potential sulfide oxidizers (Ranchou-Peyruse *et al.*, 2006) such as those related to the genera *Rhovulum* and *Rhodobacter*. In these samples, high abundances of *Roseobacter* clade related bacteria were also found. Their predominance was probably linked to the highly eutrophic state of the Berre Lagoon. Large abundances of *Roseobacter/Rhodobacter* have been observed previously associated to high nutrient conditions (Brown *et al.*, 2005). Abundance of *Roseobacter* clade were also already noticed in the retention basin (station EDB) by Ranchou-Peyruse *et al.*, (2006) through clone libraries of the *pufM* gene confirming our observation.

The sulfate-reducing community showed a dominance of *Desulfobacteraceae* and *Desulfobulbaceae* as previously described in coastal sediments (Bolhuis & Stal, 2011; Colin *et al.*, 2013; Giloteaux *et al.*, 2010; Lazar *et al.*, 2011; Lloyd *et al.*, 2010; O'Sullivan *et al.*, 2013; Zeleke *et al.*, 2013). The systematic sequencing allowed the detection of a more complex community, harvesting in addition sequences related to the *Desulfovibrionaceae* and the *Peptococcaceae*. This latter family is known to be less abundant in marine ecosystem as they have a well-adapted metabolism for low sulfate environments (Leloup *et al.*, 2006).

Cluster analyses showed that for most of the genes, site variation prevail over seasonal variation except for *pufM* cluster which is a marker for anoxygenic phototrophic bacteria. Variations were more explained by seasons than by site with *pufM* diversity. A higher diversity was observed in autumn campaigns. This higher diversity in autumn period was already described for anoxygenic phototrophic communities inhabiting the Mediterranean sea (Ferrera *et al.*, 2013). The higher abundance of *Rhodobacteraceae* related sequences detected by PCR diversity analysis couldn't be retrieved by systematic sequencing. PCR based method should make a selection depending on primers specificity, increasing the importance of some microorganisms. Ferrera *et al.*, (2013) described as well a peak of bacteria related to *Rhodobacter* and *Roseobacter* genera in the late winter and spring as we observed a higher relative abundance of *Rhodobacteraceae* family mainly related to *Rhodobacteraceae* bacterium HTCC2083 a *Roseobacter* clade bacterium in spring samples. These bacteria have been observed previously associated to high-nutrient conditions (Brown *et al.*, 2005; Guyoneaud *et al.*, 1996) or phytoplankton blooms (González *et al.*, 2000). In spite of the site clustering observed for the others functional genes, seasonal variations were found within site cluster. Conversely to *pufM*, none increase of *Rhodobacteraceae* was noticeable on *soxB* affiliated sequences in spite of their abundance among these sequences. Phototrophic sulfur oxidizing bacteria were probably more impacted by seasonal variation, i.e. light requirements for photosynthesis. Seasonal variations were marked between spring and autumn samples on both sulfate reducing bacterial markers with a higher relative abundance of the *Desulfobulbaceae* and particularly the genus *Desulfobulbus* in spring time. This should be linked to the amount of sulfate probably lower in spring due to higher precipitation measured in spring than those of the end of September (<https://donneespubliques.meteofrance.fr>). Competition experiments showed that *Desulfobulbus* strains were the best competitors when sulfate was a limiting factor (Colin *et al.*, 2013; Laanbroek *et al.*, 1984; Laanbroek & Pfennig, 1981). Seasonal variations were also noticeable with *dsrB* gene with an increase of diversity

on spring campaigns, maybe due to fresh inputs of organic material in sediments originating from spring algal/cyanobacterial blooms.

None of the environmental parameters explained the seasonal separation between spring and autumn missions. We observed nevertheless a significant influence of the organic carbon content of the sediments on the bacterial community, EDB1 community being influenced by high carbon content. This site was located on a retention basin receiving hydrocarbon-charged wastewaters from a petrochemical industry. This probably increased the amount of organic carbon and influenced the bacterial community composition but the hydrocarbon content itself didn't influence directly the bacterial community in term of toxicity. The last campaign on this site was divergent to the others samplings showing lower abundances of sulfate reducing microorganisms with higher amount of organic carbon.

The results showed that the use of these genes is complementary for the characterization of microbial communities. The both markers used for sulfate reducers showed similar picture of the community with the dominance of the *Desulfobacteraceae*, the *dsrB* marker enabling a better affiliation than *aprA* because it follows better the 16S rRNA phylogeny. However *aprA* allowed obtaining information on sulfur oxidizing bacteria. Because of their variety of metabolic pathways, the use of several genes involved in the different sulfur oxidizing metabolisms is required to have a more complete overview of the SOP. *soxB* markers give insights on phototrophic sulfur bacteria which is completed by the *pufM* approach which target the main anoxygenic phototrophic bacteria present in the mats. However this latter marker contains not only sulfur oxidizing bacteria and target some heterotrophic bacteria such as the *Rosebacter* clade related bacteria that had no direct implication on the sulfur cycle in terms of reduction or oxidation of inorganic sulfur compounds. The several functional genes used in this study allowed targeting functional group better than taxonomic gene such as 16S rRNA because of their dispersion in the tree of life. Their use is complementary enabling a deep description of the sulfur cycling microbial community

2.5. References

Aubé J, Senin P, Bonin P, Pringault O, Deflandre B, Klopp C, et al. (submitted). Diversity, activity and functioning of two microbial mats contrasted by their hydrocarbon contamination.

Aubé J, Senin P, Escudié F, Mariette J, Jeziorski C, Valière S, et al. (submitted). Structure and functioning of sulfate-reducing communities in two contrastively hydrocarbon contaminated microbial mats characterized by polyphasic approaches. ISME J.

- Béjà O, Suzuki MT, Heidelberg JF, Nelson WC, Preston CM, Hamada T, et al. (2002). Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* 415:630–633.
- Bolhuis H, Stal LJ. (2011). Analysis of bacterial and archaeal diversity in coastal microbial mats using massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *ISME J* 5:1701–1712.
- Brown MV, Schwalbach MS, Hewson I, Fuhrman JA. (2005). Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environ Microbiol* 7:1466–1479.
- Cline JD. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol Oceanogr* 14:454–458.
- Cohen Y, Jørgensen BB, Padan E, Shilo M. (1975). Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature* 257:489–492.
- Colin Y, Goñi-Urriza M, Caumette P, Guyoneaud R. (2013). Combination of high throughput cultivation and *dsrA* sequencing for assessment of sulfate-reducing bacteria diversity in sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 83:26–37.
- Ferrera I, Borrego CM, Salazar G, Gasol JM. (2013). Marked seasonality of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the coastal NW Mediterranean Sea as revealed by cell abundance, pigment concentration and pyrosequencing of *pufM* gene. *Environ Microbiol* n/a–n/a.
- Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A, Fischer J. (2005). Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol* 8:253–259.
- Frigaard N-U, Dahl C. (2008). Sulfur Metabolism in Phototrophic Sulfur Bacteria. In: *Advances in Microbial Physiology*, Robert K. Poole (ed) Vol. Volume 54, Academic Press, pp. 103–200.
- Frith MC, Hamada M, Horton P. (2010). Parameters for accurate genome alignment. *BMC Bioinformatics* 11:80.
- Geets J, Borremans B, Diels L, Springael D, Vangronsveld J, van der Lelie D, et al. (2006). *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* 66:194–205.
- Van Gemerden H. (1993). Microbial mats: a joint venture. *Mar Geol* 113:3–25.
- Ghosh W, Dam B. (2009). Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 33:999–1043.
- Giloteaux L, Goñi-Urriza M, Duran R. (2010). Nested PCR and new primers for analysis of sulfate-reducing bacteria in low-cell-biomass environments. *Appl Environ Microbiol* 76:2856–2865.
- González JM, Simó R, Massana R, Covert JS, Casamayor EO, Pedrós-Alió C, et al. (2000). Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Appl Environ Microbiol* 66:4237–4246.
- Guyoneaud R, Matheron R, Baulaigue R, Podeur K, Hirschler A, Caumette P. (1996). Anoxygenic phototrophic bacteria in eutrophic coastal lagoons of the French Mediterranean and Atlantic Coasts (Prévost Lagoon, Arcachon Bay, Certes fishponds). In: *Coastal Lagoon Eutrophication and Anaerobic Processes (C.L.E.A.N.)*, Caumette, P, Castel, J, & Herbert, R (eds) *Developments in Hydrobiology*, Springer Netherlands, pp. 33–43.
- Hipp WM, Pott AS, Thum-Schmitz N, Faath I, Dahl C, Trüper HG. (1997). Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiol Read Engl* 143 (Pt 9):2891–2902.

- Hügler M, Gärtner A, Imhoff JF. (2010). Functional genes as markers for sulfur cycling and CO₂ fixation in microbial communities of hydrothermal vents of the Logatchev field. *FEMS Microbiol Ecol* 73:526–537.
- Ihaka R, Gentleman R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J Comput Graph Stat* 5:299–314.
- Imhoff JF. (2008). Systematics of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. In: Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms, Hell, R, Dahl, DC, Knaff, D, & Leustek, T (eds) *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Springer Netherlands, pp. 269–287.
- Jørgensen BB. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulphate reduction. *Nature* 296:643–645.
- Jørgensen BB, Des Marais DJ. (1986). Competition for sulfide among colorless and purple sulfur bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol Ecol* 38:179–186.
- Koh EY, Phua W, Ryan KG. (2011). Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Antarctic sea ice and seawater. *Environ Microbiol Rep* 3:710–716.
- Kolmert A, Wikström P, Hallberg KB. (2000). A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *J Microbiol Methods* 41:179–184.
- Laanbroek HJ, Geerligs HJ, Sijtsma L, Veldkamp H. (1984). Competition for sulfate and ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* species isolated from intertidal sediments. *Appl Environ Microbiol* 47:329–334.
- Laanbroek HJ, Pfennig N. (1981). Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. *Arch Microbiol* 128:330–335.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
- Lazar CS, Dinasquet J, L'Haridon S, Pignet P, Toffin L. (2011). Distribution of anaerobic methane-oxidizing and sulfate-reducing communities in the G11 Nyegga pockmark, Norwegian Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100:639–653.
- Leloup J, Quillet L, Berthe T, Petit F. (2006). Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *FEMS Microbiol Ecol* 55:230–238.
- Lloyd KG, Albert DB, Biddle JF, Chanton JP, Pizarro O, Teske A. (2010). Spatial Structure and Activity of Sedimentary Microbial Communities Underlying a *Beggiatoa* spp. Mat in a Gulf of Mexico Hydrocarbon Seep. *PLoS ONE* 5:e8738.
- Luther GW, Findlay AJ, MacDonald DJ, Owings SM, Hanson TE, Beinart RA, et al. (2011). Thermodynamics and Kinetics of Sulfide Oxidation by Oxygen: A Look at Inorganically Controlled Reactions and Biologically Mediated Processes in the Environment. *Front Microbiol* 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00062.
- Mariette J, Escudié F, Allias N, Salin G, Noirot C, Thomas S, et al. (2012). NG6: Integrated next generation sequencing storage and processing environment. *BMC Genomics* 13:462.
- Meyer B, Imhoff JF, Kuever J. (2007). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environ Microbiol* 9:2957–2977.

- Meyer B, Kuever J. (2007). Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes--origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiol Read Engl* 153:2026–2044.
- Miller SR, Bebout BM. (2004). Variation in Sulfide Tolerance of Photosystem II in Phylogenetically Diverse Cyanobacteria from Sulfidic Habitats. *Appl Environ Microbiol* 70:736–744.
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* 35:W182–185.
- Muyzer G, Stams AJM. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6:441–454.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, et al. (2013). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-8.
- O'Sullivan LA, Sass AM, Webster G, Fry JC, Parkes RJ, Weightman AJ. (2013). Contrasting relationships between biogeochemistry and prokaryotic diversity depth profiles along an estuarine sediment gradient. *FEMS Microbiol Ecol* 85:143–157.
- Paissé S, Goñi-Urriza M, Stadler T, Budzinski H, Duran R. (2012). Ring-hydroxylating dioxygenase (RHD) expression in a microbial community during the early response to oil pollution. *FEMS Microbiol Ecol* 80:77–86.
- Petri R, Podgorsek L, Imhoff JF. (2001). Phylogeny and distribution of the soxB gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *Fems Microbiol Lett* 197:171–178.
- Pham VH, Yong J-J, Park S-J, Yoon D-N, Chung W-H, Rhee S-K. (2008). Molecular analysis of the diversity of the sulfide : quinone reductase (sqr) gene in sediment environments. *Microbiol Read Engl* 154:3112–3121.
- Ranchou-Peyruse A, Herbert R, Caumette P, Guyoneaud R. (2006). Comparison of cultivation-dependent and molecular methods for studying the diversity of anoxygenic purple phototrophs in sediments of an eutrophic brackish lagoon. *Environ Microbiol* 8:1590–1599.
- Ranchou-Peyruse A, Moppert X, Hourcade E, Hernandez G, Caumette P, Guyoneaud R. (2004). Characterization of brackish anaerobic bacteria involved in hydrocarbon degradation: A combination of molecular and culture-based approaches. *Ophelia* 58:255–262.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541.
- Stauffert M, Cravo-Laureau C, Jézéquel R, Barantal S, Cuny P, Gilbert F, et al. (2013). Impact of Oil on Bacterial Community Structure in Bioturbated Sediments. *PLoS ONE* 8:e65347.
- Wagner M, Roger AJ, Flax JL, Brusseau GA, Stahl DA. (1998). Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *J Bacteriol* 180:2975–2982.
- Watanabe T, Kojima H, Takano Y, Fukui M. (2013). Diversity of sulfur-cycle prokaryotes in freshwater lake sediments investigated using aprA as the functional marker gene. *Syst Appl Microbiol* 36:436–443.
- Zaghmouri I, Michotey VD, Guasco S, Raimbault P, Garcia N, Bernard G, et al. (2013). Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. *Mar Pollut Bull* 67:55–65.

Zelege J, Sheng Q, Wang J-G, Huang M-Y, Xia F, Wu J-H, et al. (2013). Effects of *Spartina alterniflora* invasion on the communities of methanogens and sulfate-reducing bacteria in estuarine marsh sediments. *Terr Microbiol* 4:243.

3. ETUDE PAR DES APPROCHES POLYPHASIQUES DE LA STRUCTURE ET DU FONCTIONNEMENT DES COMMUNAUTES DE SULFATO-REDUCTEURS DE DEUX TAPIS MICROBIENS AUX CONTAMINATIONS EN HYDROCARBURES CONTRASTEES

Ce travail est présenté sous la forme d'un article qui a été soumis à la revue the ISME journal sous le titre :

Structure and functioning of sulfate-reducing communities in two contrastively hydrocarbon contaminated microbial mats characterized by polyphasic approaches

Par: Johanne Aubé, Pavel Senin, Frederic Escudié, Jérôme Mariette, Céline Jeziorski³, Sophie Valière, Olivier Bouchez, Christophe Klopp, Rémy Guyoneaud, Marisol Goñi-Urriza

ABSTRACT

Sulfate-reducing prokaryotes play a key role in the carbon and sulfur cycles of marine sediments and microbial mats. In order to investigate the impact of hydrocarbon contamination on the structure and activity of the sulfate-reducing community, we compared two microbial mats located within Berre Lagoon (Southern France). In addition, since sunlight is the main energy source for microbial mats, we analyzed both sulfate-reducing communities activity during the day and at night. Addressing the limitations of studies based on a single analytical approach, we applied three complementary techniques that allowed for a comprehensive assessment of the studied microbial communities. Specifically, the use of complete metagenome and metatranscriptome sequencing allowed us to resolve discrepancies between results obtained with culture- and PCR-based techniques and provided an unprecedented insight into the community structure and functioning.

Despite a significant difference in the level of hydrocarbon contamination, the analysis of the systematic sequencing revealed that both sites were not only harboring highly similar dominant sulfate-reducing prokaryotes, but exhibiting a similar metabolism where circadian cycle was the main driving factor. *Desulfobulbus* related microorganisms were found to be highly active during the day whereas a number of other sulfate-reducers were active at night. While genes associated with the hydrocarbon degradation were detected in both sites, the low levels of their expression, although different between sites, indicated that the hydrocarbon contamination is not a key environmental factor affecting the structure and functioning of the sulfate-reducing microbial community in marine mats.

3.1. Introduction

Heavy metals, persistent organic pollutants, and hydrocarbon contaminate aquatic ecosystems worldwide through discharges, runoff and atmospheric deposition. Often, they accumulate in sediments, where anaerobic processes become main routes for their transformation (Eggleton & Thomas, 2004). Among other anaerobic bacteria, sulfate reducing prokaryotes (SRP) play a key role in biogeochemical cycles observed in coastal environments where they may be responsible for up to half of the total organic matter degradation (Jørgensen, 1982). Sulfate-reducing prokaryotes are highly versatile and capable to reduce oxidized sulfur compounds and a number of alternative electron acceptors such as nitrate, oxidized metals, and oxygen (Dannenberg *et al.*, 1992; Lovley & Phillips, 1994; Szewzyk & Pfennig, 1987). In addition to oxidizing a variety of low molecular weight organic compounds, they are able to degrade pollutants, specifically petroleum-based molecules (Pérez-Jiménez *et al.*, 2001). Finally, SRP are also involved in the metal immobilization processes in sediments by forming insoluble metal sulfides with hydrogen sulfide produced by sulfate reduction (SR) (Labrenz *et al.*, 2000).

Since sulfate reducing prokaryotes are phylogenetically diverse, spanning over four bacterial and two archaeal phyla (Muyzer & Stams, 2008), their diversity and abundance is often investigated with molecular approaches using 16S rRNA or *dsrAB* genes. Typically, these techniques highlight the dominance of representatives from the *Desulfobacteraceae* and *Desulfobulbaceae* in coastal sediments (Bolhuis *et al.*, 2013; Colin *et al.*, 2013; Giloteaux *et al.*, 2010; Lazar *et al.*, 2011; Lloyd *et al.*, 2010; O'Sullivan *et al.*, 2013; Zeleke *et al.*, 2013). In contrast, culture-based analytical techniques, while allowing to characterize the role of SRPs in an ecosystem (i.e., assess the metabolic potential of SRP), often lead to the isolation of *Desulfovibrio* related strains (Purdy *et al.*, 1997).

The significant difference in SRP diversity observed through molecular approaches and isolation-based techniques often leads to difficulties in assessing the potential roles of SRP in a studied environment. A deeper investigation of an SRP community can be performed using next-generation sequencing techniques. Although PCR-based high throughput sequencing has been recently employed to study the diversity of dissimilatory sulfite reductase B (*dsrB*) in marsh sediments (Zeleke *et al.*, 2013), no reports using metagenomic and metatranscriptomic data to describe sulfate reducing communities structure and activities exist to the best of our knowledge.

In this work, we compare the activity and functioning of the SRP community in two microbial mats having different contamination levels. In order to address the aforementioned technical gap we have combined multiple approaches. Specifically, we characterized the diversity and activity of SRP by high-throughput sequencing of the *dsrB* and 16S rRNA genes and transcripts amplicons, we determine their metabolic potential by systematic sequencing of the metagenome and their gene expression levels by sequencing the enriched mRNA metatranscriptome. Since light is one of the main parameters driving bacterial activities in microbial mats, the community activity was examined during the day and night. We also included a high throughput cultivation approach (Colin *et al.*, 2013) in order to determine the cultivated SRP fraction. In addition to biogeochemical characterization of both sampling sites, we discuss about the role of the environmental factors on the SRP community composition and/or functioning.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Site description, sample collection and Physical and chemical analyses

The Berre lagoon is a coastal lagoon of Mediterranean Sea in Southern France surrounded by industrial and urban areas. Microbial mats were collected from two different sites (Figure S1): the station EDB1, located inside a retention basin, receives hydrocarbon-charged waste-waters from a petrochemical industry (Paissé *et al.*, 2008); the station SL is located within “les Salins du Lion”, a bird reserve. Metal and hydrocarbon contents were measured in water and sediments. Microbial characterization was performed using the first 2 cm of the microbial mats. Samples were collected for molecular characterization of the diversity and activity of the SRP community during the day (2:00 pm) and at night (4:00 am). Dissolved oxygen, pH, redox potential, and temperature were measured for both time points.

Eleven metals or transition metals (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Sn and Zn) were quantified via Inductively-Coupled-Plasma Mass-Spectrometry (UT2A, France) as described in supplementary material. Sulfates and hydrogen sulfide were quantified as previously described (Cline, 1969; Kolmert *et al.*, 2000). Dissolved oxygen, pH, redox potential, and salinity were measured in situ (electrode CelLOX325, pH/MVMETRE 340 from WTW and refractometer Atago S10).

The sulfate reduction rates were determined using the single-step chromium reduction method (Fossing & Jørgensen, 1989) by adding 1 mL of $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (37 KBeq) in 5 ml of homogenized surface sediment and incubated 6h at 21°C. Specific activities of $^{35}\text{S}^{2-}$ and

$^{35}\text{SO}_4^{2-}$ were determined with a Beckman LS6500 liquid scintillation counter. Sulfate-reduction rates were calculated according to (Fossing & Jørgensen, 1989). All above described procedures were performed in triplicates.

3.2.2. Culture-based approach: Isolation and identification of SRB

High throughput technique was used for SRP isolation by following the method by (Colin *et al.*, 2013) with sulfate supplied as sole electron acceptor. SRP were isolated with the dilution-to-extinction technique after Most Probable Number determination. The optimal dilutions were inoculated in three 384-well microplates per site. Positive wells were recultivated in 96-well microplates and then in 6 mL vacuette tube (ZNo-additive, Greiner bio-one). Purities of cultures were confirmed by sequencing and through repetitive microscopic observations. Identification of isolates was performed by 16SrDNA sequencing. Detailed procedures are described in supplementary data.

3.2.3. Molecular procedures

RNA and DNA were co-extracted in triplicate using RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation kit (MOBIO) coupled with AllprepDNA/RNA mini kit and RNase-Free DNase (QIAGEN). cDNA synthesis was performed using M-MLV RT and RNase-OUT™ (Invitrogen).

Quantification of 16S rRNA and *dsrB* genes and transcripts were performed using the DyNAmoFlash SYBRGreen qPCR kit (Thermo Scientific) in a Mx3005PTM (Stratagene) as described by (Paissé *et al.*, 2012) using bac1055YF and bac1392R primers (Ritalahti *et al.*, 2006) for 16S rRNA and DSRp2060F and DSR4R primers (Geets *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 1998) for *dsrB*. The procedures are detailed in supplementary material.

3.2.4. 16SrRNA and *dsrB* gene and cDNA amplification, sequencing and bioinformatics analyses

In order to determine the SRP communities composition, the V2 and V3 region of the 16SrDNA bacterial gene and cDNA were amplified with primers 104F and 530R (Jami & Mizrahi, 2012) whereas *dsrB* gene and cDNA were amplified with the above defined primers for qPCR. Amplicons were sequenced using the MiSeq 250-paired technology (Illumina) as described in supplementary data.

16SrRNA paired raw reads were filtered, quality trimmed, and concatenated using Mothur. OTU were produced with USEARCH (Edgar, 2013) following these steps:

sequences were filtered to a minimal length of 380 and quality 10 and dereplicated, then, the resulting set was cleaned by selecting only sequences that align to SSU model with SSU-Align (Nawrocki, 2009); sequences were pre-clustered and chimeric reads were removed by using the Gold reference database (Edgar *et al.*, 2011); finally, reads were clustered into operational taxonomic units (OTUs) with a maximum distance of 3% and merged into consensus sequences. The OTU taxonomy was assigned as the taxonomy associated with the reference sequence from Greengenes tree (DeSantis *et al.*, 2006) found as the most similar using assign_taxonomy.py script from QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) which wraps Mothur (Schloss *et al.*, 2009) naive bayes classifier. Finally, OTU abundance was computed aligning each sequence to the final OTU set using USEARCH global alignment routine. Detailed procedure is shown in supplementary data.

For *dsrB* reads analyses we used the ng6 NGS platform (Mariette *et al.*, 2012) genefunc pipeline to process the data as follows. Paired reads were merged using Flash (Magoč & Salzberg, 2011) allowing up to 10% of mismatch. The set of concatenated reads was filtered on their length (350-410 nucleotides), on ambiguous bases presence (none allowed), and on usearch chimera detection results (Edgar *et al.*, 2011). Remaining sequences were translated using Framebot (Wang *et al.*, 2013). The amino acid sequences were clustered by CD-HIT (Li & Godzik, 2006) with 96% minimum identity. The cluster taxonomic affiliation was performed using blastp (Camacho *et al.*, 2009) with a custom reference database constructed from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) data using 250 DsrB sequences representing all known genus of isolated sulfate-reducing prokaryotes.

To calculate the DsrB distance between species, genera, families and orders, phylogenetic trees were constructed using the neighbour joining algorithm on Mega 5.05 software (Tamura *et al.*, 2011) with the aligned amino acid sequences (ClustalW, (Larkin *et al.*, 2007) of the custom reference database. The distances were defined at 95; 90; 75 and 70% of amino acid similarity according to the database distance and according to (Colin *et al.*, 2013). Detailed procedure is shown in supplementary data.

3.2.5. Whole meta-genome and meta-transcriptome sequencing and bioinformatics procedures

Genomic DNA libraries were constructed using the BioScientific PCR-free kit following the manufacturer's protocol. RNA-seq libraries were prepared according to Illumina's protocols on a Tecan EVO200 liquid handler using the IlluminaTruSeq Stranded

mRNA sample prep kit to analyze RNA after mRNA enrichment using Epicentre RiboZero kit, as described in the supplementary data.

The Last aligner v392 (Frith *et al.*, 2010) was used to align all filtered reads (DNA and mRNA) to KEGG genes database. Last aligner is recommended when analyzing reads from an organism for which no reference genome is available (Dorff *et al.*, 2013; Kielbasa *et al.*, 2011). The single-directional best hit information method was used to annotate each read (Moriya *et al.*, 2007). From these alignments we extracted a subset of hits associated with a set of manually selected 46 sulfate reducing prokaryotes present in KEGG database. This subset was used for quantitative analyses of species abundance and transcription levels.

3.2.6. Statistical analysis

All analyses were performed in triplicates except for isolation procedures. In order to assess the homogeneity of the molecular analysis replicates, a cluster analysis using Bray Curtis distance, was performed (Vegan package, R) (Oksanen *et al.*, 2013) using the OTUs tables as variables. For all the analysis performed, the variability between replicates was much lower than between samples. Replicates were then gathered and 100 successive random samplings of communities with a size corresponding to the minimum of sequences per replicate were realized. The normalized data are the addition of the 100 random communities in order to consider the variability in the random sampling and to obtain the maximum of the diversity from the samples (Ardilly, 2006; Lejeune, 2006). Following analyses were conducted on the normalized data. Taxonomic richness and diversity estimators were calculated using Mothur software (Schloss *et al.*, 2009). Analysis of variance and Tukey's honest significant differences (HSD) tests were performed using the MASS package (Ihaka & Gentleman, 1996), Venn diagram was constructed with *dsrB* OTUs (95% of similarity) using the VennDiagram package (Chen & Boutros, 2011) in the R software. Heatmaps were drawn with R using 50 most abundant OTUs of *dsrB* genes and transcripts.

3.2.7. Sequence data

The sequence data have been submitted to the EMBL databases under accession LM656076-LM656205.

3.3. Results

3.3.1. Physical and chemical characteristics of the sites

The sediments from the Berre lagoon retention basin (EDB1) contained higher amounts of hydrocarbons and metals (Ni, Pb, Zn, Cu, Cr) than those from the less contaminated site (SL) except for mercury (Table IV-2). Difference was also noticeable for sulfate concentration and sulfate reduction rates with EDB1 site showing higher values. During the night, pH, dissolved oxygen, temperature, and redox potential decreased, as it was previously observed (Franks & Stolz, 2009; Wieland *et al.*, 2005).

Table IV-2 : Main physical and chemical characteristics for both studied sites. Dark grey color highlights a higher than Upper Chemical Exceedance Level (UCEL) metal concentration, whereas light grey color highlights a higher than Lower Chemical Exceedance Level (LCEL), according to the sediment quality criteria for the classification of sediments developed by the Hong Kong SAR Government (ETWB, 2002).

	EDB1		SL	
	Day	Night	Day	Night
Temperature (°C)	17.5	6.3	20.5	6.3
pH	8.2	7.9	8.8	8.1
Redox potential (mV)	-143	-200	-135	-283
Dissolved oxygen (mg/L)	12.6	6.8	11.6	7.2
Salinity (g/L)	20		14	
Sulfates (mM)	20.97 ± 3.76		8.68 ± 0.63	
Hydrogen sulfide (mM)	0.04 ± 0.06		0.03 ± 0.03	
SRR(µmoles Sulfide.ml.h-1)	0.688 ± 0.100		0.126 ± 0.014	
Hydrocarbons				
Sum alkanes (ng/g)	192 870		50 225	
Sum PAHs (ng/g)	778 419		27 064	
PAHs + alkanes (µg/g)	971		77	
Elements concentrations				
Al (mg/kg)	18000 ± 1000		19910 ± 30	
As (mg/kg)	7.77 ± 0.06		4.45 ± 0.06	
Cd (mg/kg)	<0.01		1.12 ± 0.06	
Cr (mg/kg)	141.1 ± 0.5		47 ± 2	
Cu (mg/kg)	79 ± 2		34.23 ± 0.07	
Fe (mg/kg)	10500 ± 300		7550 ± 60	
Hg (mg/kg)	18.1 ± 0.5		23.05 ± 0.01	
Ni (mg/kg)	78 ± 2		15.7 ± 0.04	
Pb (mg/kg)	222 ± 28		1.8 ± 0.05	
Sn (mg/kg)	2.72 ± 0.05		0.79 ± 0.04	
Zn (mg/kg)	553 ± 11		192 ± 1	

3.3.2. Abundance, diversity and activity of SRP communities: PCR based analyses

Abundance (*dsrB* and 16S rRNA gene quantification) and expression of SRP (*dsrB* transcripts versus *dsrB* gene quantification) were determined by quantitative PCR. Slightly higher *dsrB* and total bacterial abundances were found in the less contaminated site (Figure IV-6a), but the differences were not statistically significant. The *dsrB* expression levels in both sites were higher during the day, significantly higher in the SL (less contaminated) site (Figure IV-6b). SRP accounted for around 1/5th of the total bacterial community in both mats, but around 10% when considering the active part of the community (Table IV-3). The relative abundance of the transcripts related to SRP was lower during the night, particularly at SL site.

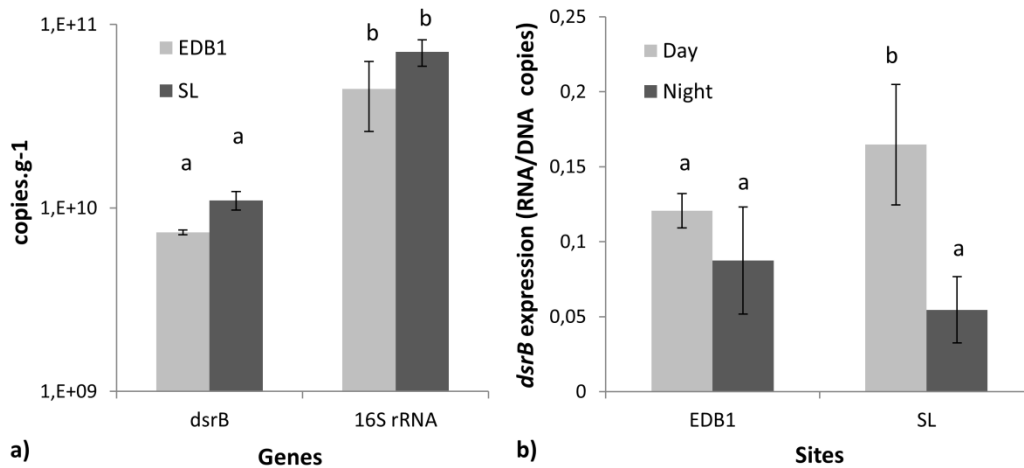


Figure IV-6 : (a) Abundance of 16S rRNA genes and *dsrB* (used as a marker for sulfate reducing prokaryotes) (b) Expression of *dsrB* gene at the day and night. Identical letters above the bars indicate that the abundances or the gene expression were not significantly different according to a Tukey HSD test ($P < 0.05$).

Table IV-3 : Relative abundance of SRP among the total bacterial community and common SRB OTUs between EDB1 and SL mats. 1) based on 16S rDNA MiSeq sequences, % of reads affiliated to SRP, 2) based on *dsrB* MiSeq sequences, 3) based on genes, 4) based on transcripts, 5) relative abundance of reads included in the common OTUs

Site	% of SRP in the community ¹			% of common OTUs ²				
	Present ³	Expressed during the day ⁴	Expressed during the night ⁴	Present ³	Relative abundance ⁵	Expressed ⁴	Relative abundance at day ⁵	Relative abundance at night ⁵
EDB1	20,34	10,13	9,33	48,00	87,73	12,38	73,21	69,94
SL	18,16	12,16	3,83	45,69	93,95	15,13	86,62	80,76

The analysis of *dsrB* and 16S rRNA genes and transcripts revealed a similar structure of SRP communities (Figure IV-7) dominated by the *Desulfobacteraceae*-related OTUs followed by the *Desulfobulbaceae*. Relative abundance of *Desulfobacteraceae*-related transcripts (*dsrB* and 16S rRNA) decreased during the day whereas *Desulfobulbaceae* increased. The *Desulfovibrionaceae* were found more abundant and active in the contaminated site (EDB1) reaching up to 1.87% of *dsrB* transcripts during the night. Contrarily, the *Desulfomicrobiaceae* were more abundant and active in SL. Other SRPs related to the *Thermodesulfobacteriaceae*, the *Peptococcaceae* (*dsrB* approach) and the *Thermodesulfovibrionaceae* (16S rRNA) were minor.

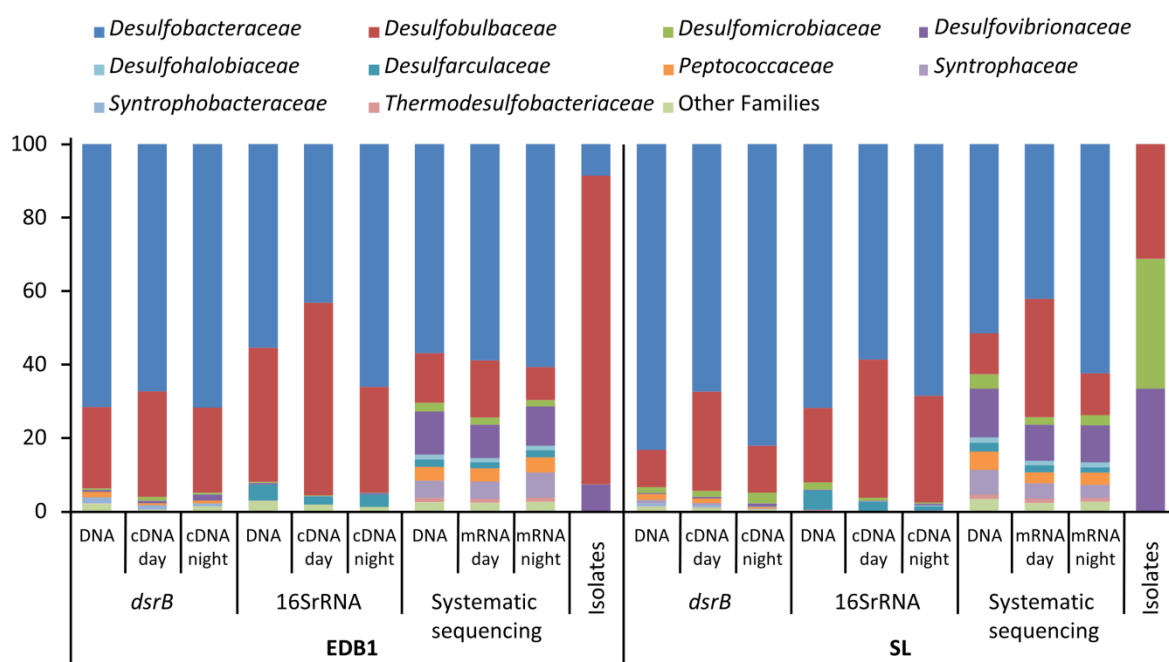


Figure IV-7: Sulfate-reducing bacteria community composition at both studied sites obtained through multiples approaches: genes and transcripts (cDNA) of the *dsrB* and the 16SrRNA (both PCR based techniques), 16S rDNA and 16S rRNA sequences obtained through the metagenomic and metatranscriptomic systematic sequencing and the culture-based approach.

Almost half of the OTU based on *dsrB* sequences were common between EDB1 and SL, but less than 16% when considering the transcript data (Figure IV-8, Table IV-3). These common OTU were highly dominant. Transcripts specifically expressed within a site accounting for less than 15% in EDB1, and 4% in SL. Few OTUs were specific to day or night conditions and represented only from 0.22% to 0.45% of the total transcripts per site. The 50 most abundant OTU (Figure IV-9) were affiliated either with the *Desulfobacteraceae*, the *Desulfobulbaceae* and the *Desulfomicrobiaceae* (1 OTU). The OTU 93 was affiliated with the *Desulfobacteraceae* and was dominant at EDB1 site (15.6% of the reads) and the unaffiliated OTU 88 at SL site (10.9 %). *Desulfobulbus* related OTUs (OTU1533, OTU137, OTU 4674) were more active during the day in one or both sites. Conversely, *Desulfocapsa* related OTUs 182; 146; 240 and 1902 were more active during the night. Similarly, *Desulfococcus* related OTU 176 and 382 had a higher expression level during the night in SL site. OTUs related to *Desulfatibacillum*, an oil degrading SRB (OTUs 152, 175 and 3551) were found in both sites, but they were slightly more abundant and more active in the not hydrocarbon contaminated SL site than in the retention basin receiving hydrocarbon-charged wastewaters site EDB1.

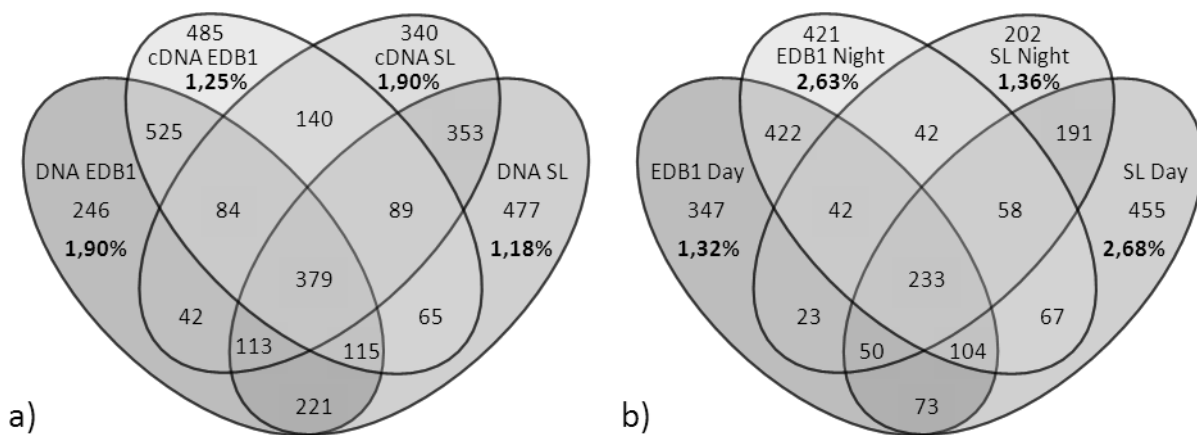


Figure IV-8 : Venn diagram representing (a), the OTU richness (based on *dsrB* genes and transcripts) shared between sites and (b), the OTU richness shared between transcripts found in both sites during day or night conditions. Percentages in bold characters are the relative abundance of reads for the considered samples or conditions

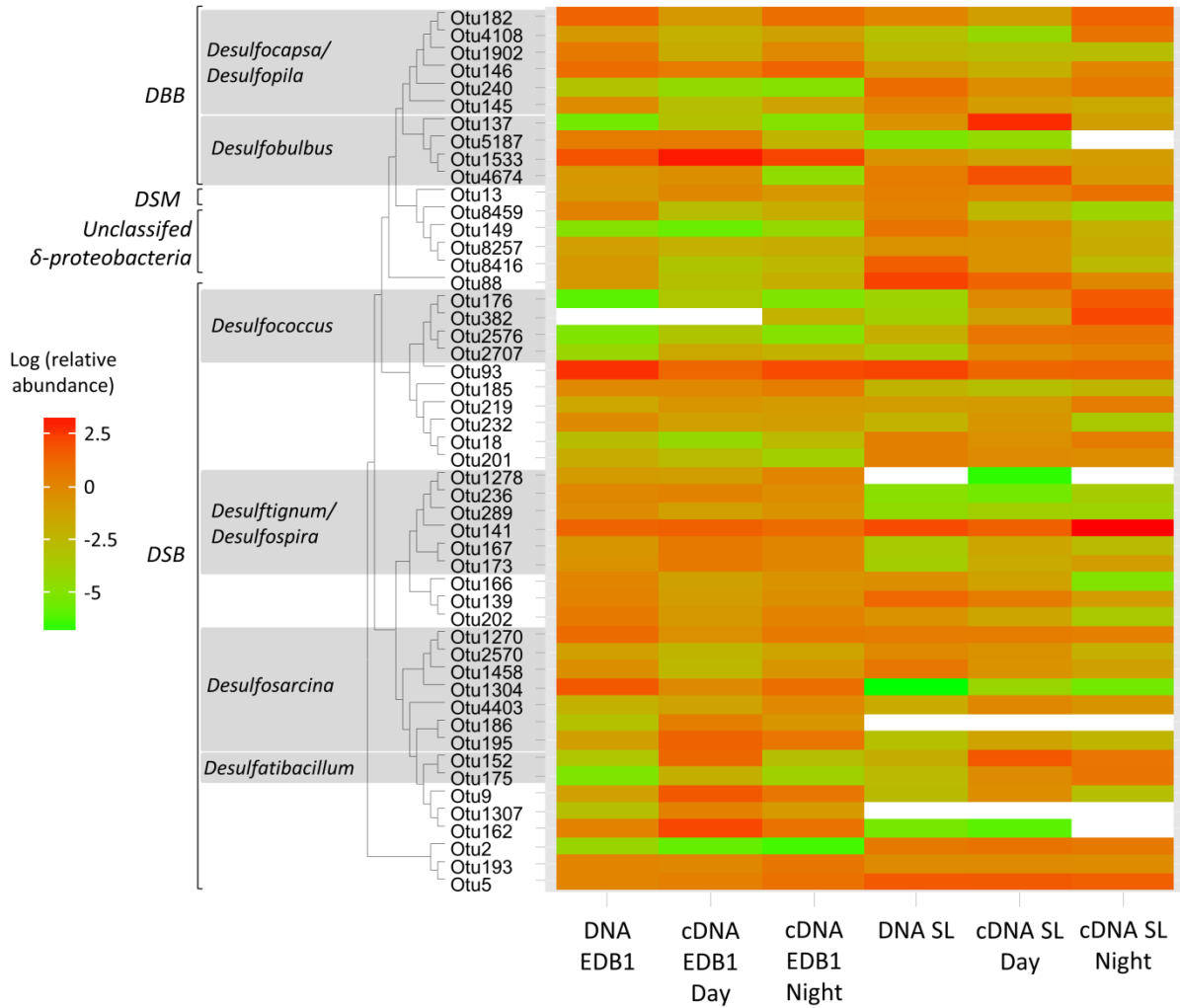


Figure IV-9 : Heatmap representation of the relative abundance of the 50 most abundant OTU among *dsrB* genes and transcripts. A white background indicates no hits for the OTU. A neighbour joining phylogenetic tree of amino acids similarity clustered representative sequences of *dsrB* OTUs. The 50 most abundant OTU represented more than 70% of the *dsrB* sequences for all the samples.

3.3.3. Abundance, diversity and activity of SRP communities: culture-based approach

Cultivable SRB abundance reached $2.81(\pm 0.76) \cdot 10^7$ cells.cm⁻³ in EDB1 mats and $1.04(\pm 0.47) \cdot 10^7$ cells.cm⁻³ in SL. With a 10^{-7} dilution microplates inoculation, 97 strains were isolated and identified from the retention basin (EDB1) and 57 from the bird sanctuary (SL); among them, 85% were related to true sulfate-reducers. They clustered into 25 OTUs, 18 isolated from EDB1 and 13 from SL. Only 6 OTUs were common but represented 68.29% and 43.75% of EDB1 and SL isolates. SRB strains were affiliated within the *Desulfovibrionales* and the *Desulfobacterales*. Based on 97% similarity for species delineation, 4 phylotypes among the 25 described constituted new taxa (Table S1). SRB

isolates diversity in EDB1 (Figure IV-7 and Annexe2 Figure S3) was dominated by *Desulfobulbaceae* affiliated strains (84% of the strains). The dominant OTU (OTU 1, 35% of the isolates) was affiliated with the misnamed *Desulfobacterium catecholicum* NZva20 (Suzuki *et al.*, 2007). *Desulfobacteraceae* related strains (9%, OTU 7, 17 and, 19) were exclusively found in EDB1. OTU 7 was the main phylotype within the *Desulfobacteraceae* and was related to the *Desulfobacula toluolica* Tol2 strain, known as hydrocarbon degrader. SRB isolates in SL (Figure IV-7 and Annexe2 Figure S2) were fairly distributed between three families: *Desulfovibrionaceae*, *Desulfobulbaceae* and *Desulfomicrobiaceae*. *Desulfomicrobiaceae* isolates (OTU 3) were exclusively found in the SL site and represented the main phylotype.

3.3.4. Abundance, diversity and activity of SRP communities: systematic sequencing

Metagenomic and metatranscriptomic systematic sequencing assigned most of the reads related to SRP to the *Desulfobacteraceae*, (42-62% of the SRB related reads), as observed by PCR approaches (Figure IV-7). The *Desulfobulbaceae* and the *Desulfovibrionaceae* affiliated reads were also highly represented; the former constituting 9-32% of the SRB. The *Desulfovibrionaceae* accounted for up to 13% of the SRB whereas they represented less than 1% through PCR sequencing techniques. Systematic sequencing allows to detect Archaea in the sulfate reducing community; *Archaeoglobaceae* related OTUs representing less than 1.5% of the sulfate reducer metagenomics reads. As for PCR sequencing *Desulfobulbaceae* were detected more active during the day.

3.3.5. Functional data analysis: Structure and activity of the SRB communities

The metagenome and metatranscriptome of sulfate reducer community were extracted from the overall microbial mat community. 3345 genes and transcripts could be affiliated to SRP according to the KEGG database. As expected, the metatranscriptome contained a high proportion of transcripts encoding proteins involved in sulfate reduction (Figure IV-10). All together, they accounted from 14.21 to 17.16% of the metatranscriptome of sulfate reducers for both sampling sites, but only 1% of the SRP metagenome (Annexe2 Table S2), demonstrating that they were overexpressed. As observed with the quantification of *dsrB* transcripts, the *dsrAB* and the *aprA* transcripts were more active during the day. Sulfate permease SulP was the main enzyme allowing the transport of electron acceptors into the cells

whereas thiosulfate sulfur transferase (*tst*) transcripts were scarce, suggesting that thiosulfate is not an important electron acceptor.

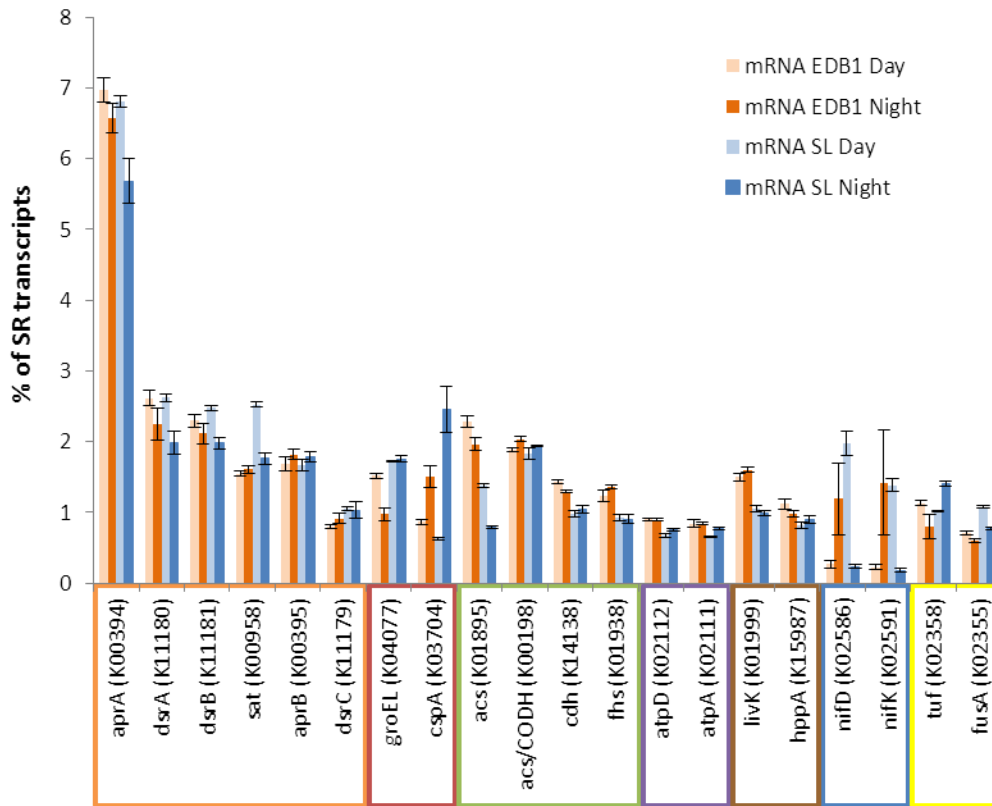


Figure IV-10: Relative abundance of the 20 most abundant SR transcripts (obtained from the metatranscriptomic dataset) and their related ortholog group number from KEGG. Sulfate reduction related transcripts are enclosed in the orange box, stress response gene in the red box, Wood-Ljungdahl pathway in the green box, ATP production in the purple box, membrane transport in the brown box, nitrogen fixation in the blue box and translation related genes in the yellow box. Abbreviations are: acs/CODH, acetyl-CoA synthase/CO dehydrogenase; aprAB, adenylylsulfate reductase; atpAD, F-type H⁺-transporting ATPase subunit alpha and beta; cdhC, CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase complex; cspA, cold shock protein (beta-ribbon, CspA family); dsrABC, dissimilatory sulfite reductase complex; fhs, formate-tetrahydrofolate ligase; fusA, elongation factor G; groEL, chaperonin GroEL; hppA, K(+)-stimulated pyrophosphate-energized sodium pump; livK, branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein; nifDK, nitrogenase; sat, sulfate adenylyl transferase; tuf, elongation factor Tu.

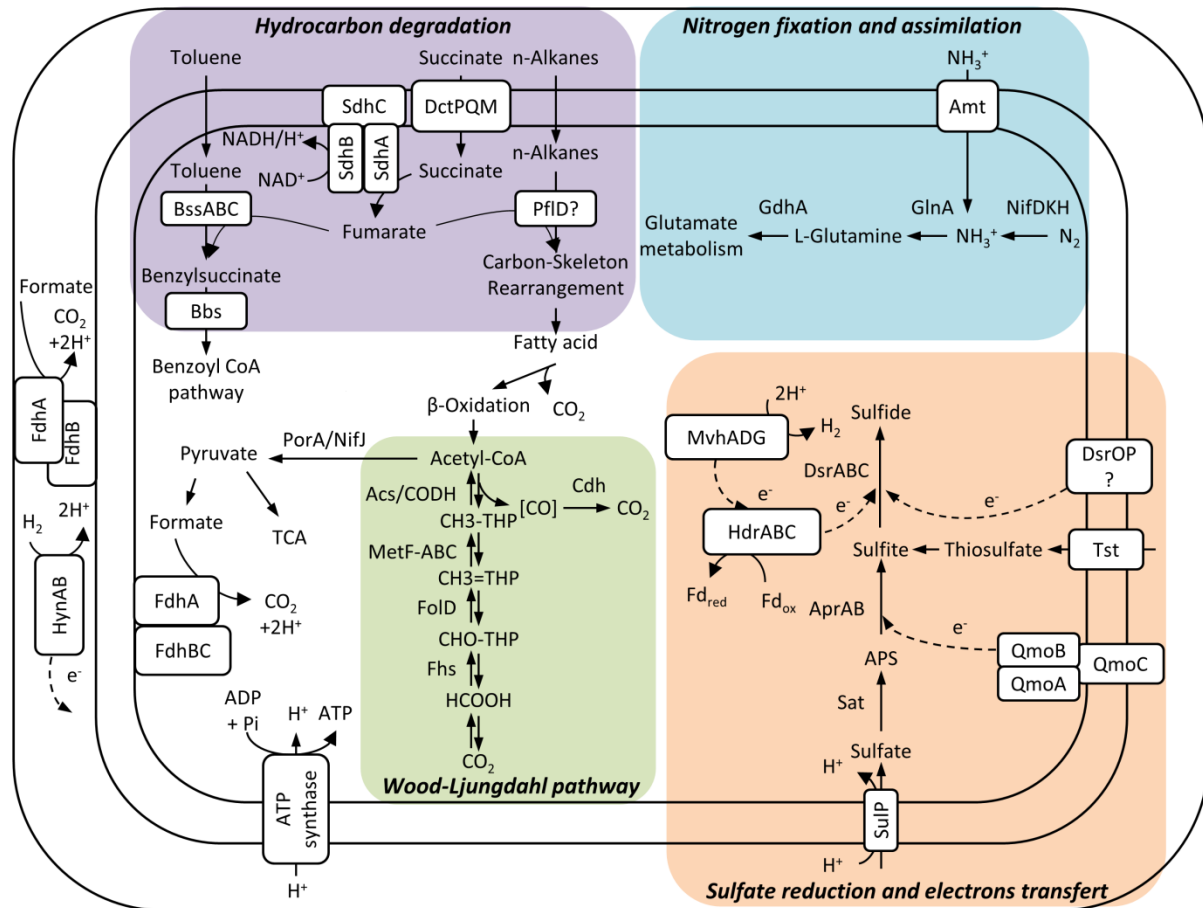


Figure IV-11: Metabolic reconstruction of the main metabolic routes detected in the SRP communities. The cytoplasmic membrane is shown in grey. Arrows indicate central metabolic pathways of the community and dashed lines indicate putative electron flows. Sulfate reduction pathway is shown in the green box, nitrogen fixation and assimilation in the blue box, wood-ljungdahl pathway in the red box and hydrocarbon pathway mainly link to EDB1 sampling site in the orange box. Abbreviations are: Acs/CODH, acetyl-CoA synthase/CO dehydrogenase; Amt, ammonium transporter; AprAB, adenylylsulfate reductase; Bbs, enzymes for the modified β -oxidation to benzoyl-CoA; BssABC, benzylsuccinate synthase; Cdh, CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase complex; DctPQM, TRAP-type C4-dicarboxylate transporteur; DsrABC, dissimilatory sulfite reductase complex; DsrOP, transmembrane dissimilatory sulfite reductase complexe; FdhABC, formate dehydrogenase; Fhs, formate-tetrahydrofolate ligase; Fols, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase; GdhA, glutamate dehydrogenase; GlnA, glutamine synthetase; HrdABC, heterodisulfite reductase; HynAB, periplasmique [Ni/Fe] hydrogenase; MetF-ABC, methylenetetrahydrofolate reductase; MvhADG methyl viologen-reducing hydrogenase; NifDKH, nitrogenase; PfID, putative alkylsuccinate synthase; PorA/NifJ pyruvate:ferredoxin oxidoreductase; QmoABC, quinone-interacting membrane-bound oxidoreductase complex; Sat, sulfate adenylyl transferase; SdhABBC, succinate dehydrogenase/fumarate reductase; SulP, sulfate permease; Tst, thiosulfate sulphur transferase.

Concerning electron transport systems, a quinone coupled membrane bound (QmoABC) involved in the direct transfer of electrons to the APS reductase (Ramos *et al.*, 2012) was found overexpressed (related to DNA reads) representing up to 1.69% of SRP transcripts on SL day. The heterodisulfite reductase subunits A, B and C (HdrABC) and the subunits DsrO and DsrP from DsrMKJOP complex were abundant in both sites representing from 0.43 to 0.87% of SRP transcripts for HdrABC and 0.44 to 0.77% for DsrOP. The sulfate reducer community expressed the entire NuoABCDEFGHIJKLMN cluster from the NADH ubiquinone oxidoreductase, as well as all the subunits of the F-type H⁺-transporting ATPase. These last transcripts accounted for half of the transcripts from the oxidative phosphorylation pathway.

Carbon metabolism was dominated by the Wood-Ljungdahl (WL) pathway which operates both in CO₂ assimilation and energy metabolism. All the transcripts required for the reductive acetyl-CoA pathway were detected among the most abundant transcripts (Figure IV-10) and were generally overexpressed. The synthesis of pyruvate was accomplished by the putative pyruvate-flavodoxin oxidoreductase NifJ/PorA which was as well overexpressed suggesting that CO₂ was an important carbon source for the SRP (Figure IV-11) as previously reported (Kleindienst *et al.*, 2014; Rabus *et al.*, 2006). Complete oxidation by the SRP community was also realized through the TCA cycle since SR meta-transcriptome contained all the transcripts required for a complete TCA cycle but they were less expressed than the WL pathway genes (Annexe2 Table S2). Only the malate dehydrogenase [EC:1.1.1.37] was overexpressed in both sites at day/night conditions (data not shown).

Sulfate reducer communities were able to use long chain fatty acids as the long-chain acyl-CoA synthetase (*fadD*) was present and active. Although the alkylsuccinate synthase was not found neither in the metagenomes nor in the metatranscriptomes, a pyruvate-formate lyase activating enzyme (PflC) and a formate C-acetyltransferase (PflD) were present in both sites and were overexpressed in hydrocarbon contaminated site. These transcripts were mainly affiliated to the oil degrading bacterium *Desulfatibacillum alkenivorans* (accounting from 58.9% to 64.8% of the *pflD* transcripts, as example). PflD could act as an alkylsuccinate synthase and could be involved in alkane degradation, as suggested by Khelifi *et al.*, (2014). Sulfate reducer community from the EDB1 site seems also able to degrade aromatic hydrocarbons as they expressed the whole genes involved in the transformation of toluene into benzyl-CoA through the fumarate addition with the benzylsuccinate synthase (Figure IV-11 and Annexe2 Table S2). These genes were mainly related to those present in

Desulfobacula spp. and, in a lesser extent, in *Desulfatibacillum* spp. Some of the genes and transcripts from the toluene degradation pathway were detected in SL site but at very low levels.

Genes related to oxidative stress protection including peroxiredoxins, superoxide reductases, catalase-peroxidases, three superoxide dismutases and three thioredoxins, were detected on the metagenome and on the metatranscriptome of sulfate reducers, probably to protect against the dynamic change of oxic/anoxic interfaces in microbial mat (Figure IV-10 and Annexe2 Table S2). Among them, transcripts affiliated with *Desulfobulbus* were more important during the day at both sites and particularly at SL.

The genes *nifD*, *nifK*, *nifH* were found among the most active genes (Figure IV-10); they encode for the subunits of the nitrogenase molybdenum-iron protein. The nitrogenase regulatory proteins NifHD1 and NifHD2 were also highly expressed. These genes involved in nitrogen fixation showed higher expression level in SL during the day whereas their expression was higher at night in EDB1 (Figure IV-10 and Table S2). The role of SRP in nitrogen fixation varied depending on sites and during the diel cycle; transcripts related to SRP accounted for 64% of the nitrogenase transcripts in SL during the day but only for 1.4% at night. No diel variations could be observed in EDB1. The nitrogenase genes were dominated by reads related to the *Desulfovibrio* and *Desulfatibacillum* genera and to the *Desulfovibrio*, *Desulfocapsa* and, *Desulfobulbus* genera for the day transcripts, whatever the site. During the night, many differences could be observed for transcripts affiliation between sites and between subunits of the nitrogenase. The observed differences at night are also found when analyzing other nitrogen-fixing organisms, the *Cyanobacteria*, EDB1 site showed high proportion of *Pleurocapsa* nitrogenase transcripts whereas SL transcripts displayed transcripts related to *Nostocales*. Genes involved in the assembly and incorporation of iron and molybdenum atoms into the nitrogenase subunits (*nifE*, *nifN*, *nifB* and *nifU*) were found also active but their expression levels were lower than for nitrogenase subunits.

3.3.6. BSR isolates among metagenomic and metatranscriptomic data

In order to determine the importance of isolates in the community, the metagenomic and 16SrRNA gene MiSeq data were aligned against the isolates' 16S sequences. OTUs isolated in EDB1 represented 4.8% of 16S EDB1 metagenomic reads and 4% of 16SrDNA EDB1 MiSeq reads. For SL, the isolated OTUs represented only 1.5% of the 16S metagenomic data and 1.3% of MiSeq reads. Considering the sulfate reducers fraction of the

bacterial community, isolates represented 19.8% of the relative abundance in EDB1 and 7.4% in SL. Except for OTU6 (2 isolates from EDB1) all the OTUs were detected among metagenomic data; however OTUs 10, 12, 17 and 24 (7 strains) related to *Desulfovibrio*, *Desulfobacter* and *Desulfotalea* genera were not detected within 16S rRNA gene or transcripts MiSeq data. OTUs 1, 2, 3, 5, 6 and 7 were observed among the 50 most abundant SRP OTUs within 16S rRNA MiSeq data; OTU 1 and 2 represented more than 1% of the total bacterial community. OTU 1 (affiliated with *Desulfobacterium catecholicum*) was more abundant and more active in EDB1 than in SL. Five strains affiliated with *Desulfobacula toluolica* (OTU 7), known as hydrocarbon degrader, were found exclusively at the contaminated site, and represented 0,9% of DNA sequences and 0,1% of transcripts. A complete toluene degrading pathway related to the *Desulfobacula toluolica* was expressed exclusively in EDB1 site.

3.3.7. Discussion

SRP represent a key functional group in microbial mats and marine sediments since they are responsible for up to half of the organic matter mineralization. This study describes how the SRP community are structured and functioned in microbial mats and how it can be affected by petroleum contamination. In this comparative study, two microbial mats have been considered; both mats were similar regarding their main environmental parameters, the major difference being hydrocarbon contamination. We attempt to address limitations of a typical environmental study based on the SRP community diversity providing an overview of community structure but also assessing their activities.

To achieve this goal, we combined molecular, biogeochemical, and culture-based approaches in order to construct a comprehensive community model. We determined the *dsrB* gene diversity in microbial mats through high throughput sequencing allowing us to support the high SRP diversity. Our results confirm and extend previous studies indicating that microbial mats are probably among the most diverse marine ecosystem (Bolhuis & Stal, 2011). But, how can we infer a comprehensive picture of this diversity? Most of the researchers consider PCR approaches better than culture-based ones for diversity measurement, because many bacteria can not be cultivated. Our data indicates that PCR crushed the relative abundance of the minor groups and amplified the dominant ones. On the contrary, culture-based approaches make a selection of faster growing organisms. Metagenomic systematic sequencing showed “middle” diversity, the dominant groups found

by PCR approaches are really dominant but not so much and the isolates are not so minority. Both investigated sites are very similar except for their hydrocarbon contamination level. Although only a fraction of the SRP community is common in those sites, these common OTUs represented the dominant SRP. The presence of microorganisms does not suppose that they are active in the ecosystem. Of course, the bacterial activity is sample dependent. Because light is one of the main parameters determining microbial mats activity, we analyzed the active part of the SRP community during the day and at night. To our knowledge this is the first study where diel variations were assessed on the SRP community. The sulfate reducing activities were higher during the day, whatever the site and the approach used, which was unexpected because of the sulfate reducers oxygen sensitivity. However, this report is not the first one demonstrating higher sulfate reducing activity in light conditions, Blaabjerg *et al.*, (1998) observed a positive correlation between sulfate reduction rates and root+rhizome biomass and suggested that SRP stimulation at light may be due to increased root exudation. Since microbial mats are highly colonized by cyanobacteria (van Gemerden, 1993), the organic matter production can also be the cause of the higher expression rates during the day. Moreover, diel variations modified the structure of the active species of the SRP community, the *Desulfobulbaceae* being more active during the day. Some strains related to the genus *Desulfobulbus* can survive in micro-oxic conditions or even tolerate high concentration of oxygen (Dilling & Cypionka, 1990; Fan *et al.*, 2012). But tolerance can not explain the observed enhanced activity. Functional data exhibits as well day transcripts of stress response genes, mainly affiliated to *Desulfobulbus* genus. Therefore, the *Desulfobulbus* populations found in the microbial mats may have a selective advantage on other SRP during the day through their tolerance to oxygen, their active response to support stress and the enhanced production of organic matter by primary producers in the mats. Conversely, some OTU affiliated to the *Desulfococcus* and *Desulfocapsa* genera were found more active during the night. This could be linked to their sensitivity to oxygen as already observed by Fourçans *et al.*, (2008), i.e., a downward migration of *Desulfococcus* related organisms when oxygen penetrates the mat to escape from the oxic surface.

The main expressed metabolisms were similar for both mats. Although the high diversity of energetic metabolisms of SRP, their main energetic metabolism was the sulfate reduction coupled to the Wood-Ljungdahl pathway. Few minor differences were observed such as the nitrogen fixation genes overexpressed during the day at SL site and at night in the contaminated site.

The hydrocarbon contamination induced specific hydrocarbon degradation metabolisms. Those metabolisms constitute a minor part of the SR community metabolism, and their activation is not the consequence of specific selection but of specific induction. A hydrocarbon effect in the selection of genes involved in their aerobic degradation has been described in the sediments impacted by the Deepwater Horizon oil spill (Mason *et al.*, 2012), but it was not the case for the SRP hydrocarbonoclastic genes. Indeed, sequences related to *Desulfatibacillum alkenivorans*, a well known hydrocarbonoclastic SRB, were detected more abundant and more active in the uncontaminated site. However, genes involved in hydrocarbon degradation metabolisms associated to this microorganism were found overexpressed exclusively in the contaminated site. The sole taxonomic based study would lead to the misinterpretation of these results, i.e., more hydrocarbon degradation potential in the uncontaminated site. Culture-based approaches showed a bacterial selection, since around 5% of the isolated strains were related to *Desulfobacula* spp. in the contaminated site. Until now, only two species from this genus were describe and were affiliated to the *Desulfobacula phenolica* and the *Desulfobacula toluolica* oil degrading bacteria (Rabus *et al.*, 1993). Molecular data identified related organisms as minor in the community. Functional data allowed the detection of *Desulfobacula toluolica* with the functional pathway of toluene degradation expressed at low level, principally in the hydrocarbon contaminated site.

The global structure and functioning of sulfate reducing bacteria in the microbial mats are not affected by the hydrocarbon contamination. There is nevertheless an adaptation to this pollution by the activation of the genes necessary to degrade it, but without selection of specific strains, at least among the dominant bacteria. In comparison, higher effect is observed with natural changes such as the diel modifications, where specific bacteria are induced others inhibited. Stress genes are among the most expressed genes, probably induced to respond to such changes. Finally, the molecular diversity picture alone doesn't give an accurate conclusion about the role of SRB in the ecosystem.

3.4. References

Ardilly P. (2006). Les techniques de sondage. Editions TECHNIP.

Blaabjerg V, Mouritsen KN, Finster K. (1998). Diel cycles of sulphate reduction rates in sediments of a *Zostera marina* bed (Denmark). *Aquat Microb Ecol* 15:97–102.

Bolhuis H, Fillinger L, Stal LJ. (2013). Coastal Microbial Mat Diversity along a Natural Salinity Gradient. *PLoS ONE* 8:e63166.

- Bolhuis H, Stal LJ. (2011). Analysis of bacterial and archaeal diversity in coastal microbial mats using massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *Isme J* 5:1701–1712.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336.
- Chen H, Boutros PC. (2011). VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* 12:35.
- Cline JD. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol Oceanogr* 14:454–458.
- Colin Y, Goñi-Urriza M, Caumette P, Guyoneaud R. (2013). Combination of high throughput cultivation and *dsrA* sequencing for assessment of sulfate-reducing bacteria diversity in sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 83:26–37.
- Dannenberg S, Kroder M, Dilling W, Cypionka H. (1992). Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 158:93–99.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72:5069–5072.
- Dilling W, Cypionka H. (1990). Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 71:123–127.
- Dorff KC, Chambwe N, Zeno Z, Simi M, Shakhovich R, Campagne F. (2013). GobyWeb: Simplified Management and Analysis of Gene Expression and DNA Methylation Sequencing Data. *PLoS ONE* 8:e69666.
- Edgar RC. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10:996–998.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinforma Oxf Engl* 27:2194–2200.
- Eggleton J, Thomas KV. (2004). A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environ Int* 30:973–980.
- Fan L-F, Tang S-L, Chen C-P, Hsieh H-L. (2012). Diversity and Composition of Sulfate- and Sulfite-Reducing Prokaryotes as Affected by Marine-Freshwater Gradient and Sulfate Availability. *Microb Ecol* 63:224–237.
- Fossing H, Jørgensen BB. (1989). Measurement of bacterial sulfate reduction in sediments: Evaluation of a single-step chromium reduction method. *Biogeochemistry* 8:205–222.
- Fourçans A, Ranchou-Peyruse A, Caumette P, Duran R. (2008). Molecular analysis of the spatio-temporal distribution of sulfate-reducing bacteria (SRB) in Camargue (France) hypersaline microbial mat. *Microb Ecol* 56:90–100.
- Franks J, Stolz JF. (2009). Flat laminated microbial mat communities. *Earth-Sci Rev* 96:163–172.
- Frith MC, Hamada M, Horton P. (2010). Parameters for accurate genome alignment. *BMC Bioinformatics* 11:80.

- Geets J, Borremans B, Diels L, Springael D, Vangronsveld J, van der Lelie D, et al. (2006). DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* 66:194–205.
- Van Gemerden H. (1993). Microbial mats: a joint venture. *Mar Geol* 113:3–25.
- Giloteaux L, Goñi-Urriza M, Duran R. (2010). Nested PCR and new primers for analysis of sulfate-reducing bacteria in low-cell-biomass environments. *Appl Environ Microbiol* 76:2856–2865.
- Ihaka R, Gentleman R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J Comput Graph Stat* 5:299–314.
- Jami E, Mizrahi I. (2012). Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. *PLoS ONE* 7:e33306.
- Jørgensen BB. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulphate reduction. *Nature* 296:643–645.
- Khelifi N, Amin Ali O, Roche P, Grossi V, Brochier-Armanet C, Valette O, et al. (2014). Anaerobic oxidation of long-chain n-alkanes by the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon, *Archaeoglobus fulgidus*. *ISME J*. <http://www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/full/ismej201458a.html> (Accessed July 23, 2014).
- Kiełbasa SM, Wan R, Sato K, Horton P, Frith MC. (2011). Adaptive seeds tame genomic sequence comparison. *Genome Res* 21:487–493.
- Kleindienst S, Herbst F-A, Stagars M, von Netzer F, von Bergen M, Seifert J, et al. (2014). Diverse sulfate-reducing bacteria of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* clade are the key alkane degraders at marine seeps. *ISME J*. <http://www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/full/ismej201451a.html> (Accessed June 13, 2014).
- Kolmert A, Wikström P, Hallberg KB. (2000). A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *J Microbiol Methods* 41:179–184.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
- Lazar CS, Dinasquet J, L'Haridon S, Pignet P, Toffin L. (2011). Distribution of anaerobic methane-oxidizing and sulfate-reducing communities in the G11 Nyegga pockmark, Norwegian Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100:639–653.
- Lejeune M. (2006). *La théorie des sondages*. Images des Mathématiques, CNRS.
- Li W, Godzik A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659.
- Lloyd KG, Albert DB, Biddle JF, Chanton JP, Pizarro O, Teske A. (2010). Spatial Structure and Activity of Sedimentary Microbial Communities Underlying a *Beggiatoa* spp. Mat in a Gulf of Mexico Hydrocarbon Seep. *PLoS ONE* 5:e8738.
- Lovley D, Phillips E. (1994). Novel Processes for Anaerobic Sulfate Production from Elemental Sulfur. *Appl Environ Microbiol* 60:2394–2399.
- Magoč T, Salzberg SL. (2011). FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics* btr507.

- Mason OU, Hazen TC, Borglin S, Chain PSG, Dubinsky EA, Fortney JL, et al. (2012). Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J* 6:1715–1727.
- Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* 35:W182–185.
- Muyzer G, Stams AJM. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6:441–454.
- Nawrocki E. (2009). Structural RNA Homology Search and Alignment Using Covariance Models. Electron Theses Diss. <http://openscholarship.wustl.edu/etd/256>.
- O'Sullivan LA, Sass AM, Webster G, Fry JC, Parkes RJ, Weightman AJ. (2013). Contrasting relationships between biogeochemistry and prokaryotic diversity depth profiles along an estuarine sediment gradient. *FEMS Microbiol Ecol* 85:143–157.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, et al. (2013). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-8.
- Paissé S, Coulon F, Goñi-Urriza M, Peperzak L, McGenity TJ, Duran R. (2008). Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 66:295–305.
- Paissé S, Goñi-Urriza M, Stadler T, Budzinski H, Duran R. (2012). Ring-hydroxylating dioxygenase (RHD) expression in a microbial community during the early response to oil pollution. *FEMS Microbiol Ecol* 80:77–86.
- Pérez-Jiménez JR, Young LY, Kerkhof LJ. (2001). Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfite reductase (*dsrAB*) genes. *FEMS Microbiol Ecol* 35:145–150.
- Purdy KJ, Nedwell DB, Embley TM, Takii S. (1997). Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the occurrence and selection of sulfate-reducing bacteria in response to nutrient addition to sediment slurry microcosms from a Japanese estuary. *FEMS Microbiol Ecol* 24:221–234.
- Rabus R, Hansen TA, Widdel F. (2006). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In: *The Prokaryotes*, Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E, Schleifer, K-H, & Stackebrandt, E (eds), Springer New York: New York, NY, pp. 659–768. http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F0-387-30742-7_22.pdf (Accessed June 4, 2013).
- Rabus R, Nordhaus R, Ludwig W, Widdel F. (1993). Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 59:1444–1451.
- Ramos AR, Keller KL, Wall JD, Pereira IAC. (2012). The Membrane QmoABC Complex Interacts Directly with the Dissimilatory Adenosine 5'-Phosphosulfate Reductase in Sulfate Reducing Bacteria. *Front Microbiol* 3:137.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541.
- Suzuki D, Ueki A, Amaishi A, Ueki K. (2007). *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, rod-like, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:520–526.
- Szewzyk R, Pfennig N. (1987). Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov. *Arch Microbiol* 147:163–168.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.

Wagner M, Roger AJ, Flax JL, Brusseau GA, Stahl DA. (1998). Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *J Bacteriol* 180:2975–2982.

Wang Q, Quensen JF, Fish JA, Lee TK, Sun Y, Tiedje JM, et al. (2013). Ecological Patterns of *nifH* Genes in Four Terrestrial Climatic Zones Explored with Targeted Metagenomics Using FrameBot, a New Informatics Tool. *mBio* 4:e00592–13.

Wieland A, Zopfi J, Benthien M, Köhl M. (2005). Biogeochemistry of an iron-rich hypersaline microbial mat (Camargue, France). *Microb Ecol* 49:34–49.

Zelege J, Sheng Q, Wang J-G, Huang M-Y, Xia F, Wu J-H, et al. (2013). Effects of *Spartina alterniflora* invasion on the communities of methanogens and sulfate-reducing bacteria in estuarine marsh sediments. *Terr Microbiol* 4:243.

4. CONCLUSION DU CHAPITRE

Ce quatrième chapitre s'est particulièrement intéressé aux microorganismes impliqués dans le cycle du soufre. Il a permis de mettre en évidence une population de sulfo-oxydantes composée de chimiotrophes et de phototrophes affiliées aux *Alpha-*, *Gamma-* et *Betaproteobacteria*. Parmi les phototrophes beaucoup de séquences sont liées aux phototrophes pourpres au sein desquelles les *Chromatiaceae* et les *Rhodobacteraceae* dominent, ces dernières étant associées à l'état eutrophe de l'étang de Berre. Les gènes utilisés pour cibler les communautés de sulfo-oxydantes ont montrés des variations saisonnières. Cette variation est plus marquée chez les organismes phototrophes, ce qui est probablement dû à leur besoin de lumière pour la photosynthèse. Pour approfondir cette observation, le chapitre suivant s'intéressera aux organismes fixateurs de carbone comprenant les organismes photosynthétiques et leurs variations saisonnières.

Les séquences des gènes ciblant les sulfato-réducteurs étaient majoritairement affiliées à des *Desulfobacteraceae* et des *Desulfobulbaceae*. Les utilisations conjointes de différentes techniques moléculaires nous ont permis d'observer une plus forte abondance et activité de *Desulfovibrionaceae* et de *Peptococcaceae* qui étaient jusqu'alors peu décrites dans les environnements marins par les techniques de PCR, l'amplification exponentielle écrasant les communautés moins abondantes. La communauté des sulfato-réducteurs a été plus profondément explorée lors d'une campagne de printemps, période où les sulfato-réducteurs étaient observés plus abondamment pour les gènes et les transcrits (chapitre III). Les variations jour/nuit ont été examinées sur cette campagne et une plus forte activité des sulfato-réducteurs a été observée en journée malgré leur sensibilité connue pour l'oxygène. Les bactéries sulfato-réductrices semblent stimulées en journée, probablement par l'apport de carbone organique des photosynthétiques. De plus, l'étude sur la diversité des BSR montre une variation dans la population des BSR actives, les *Desulfobulbaceae* représentant une part plus importante de la communauté active en journée, cette famille pourrait potentiellement présenter des souches tolérantes à l'oxygène. Elle a par ailleurs été retrouvée plus active sur les campagnes de printemps probablement grâce à sa meilleure compétitivité face à de plus faibles concentrations en sulfate. Le grand nombre de souches affiliées au *Desulfobulbaceae* qui ont été isolées dans la deuxième partie de ce chapitre pourraient par la suite être testé pour leurs capacités à résister à l'oxygène, afin de mieux comprendre les variations nyctémérales observées sur la communauté active des BSR.

La structure globale du tapis microbien contaminé ne semble pas affectée par la contamination, on observe néanmoins des bactéries hydrocarbonoclastes affiliés au genre *Desulfobacula* sur le site contaminé au travers des méthodes culturales et moléculaires employées ici pour décrire la communauté. Des gènes impliqués dans la dégradation des alcanes et des hydrocarbures aromatiques ont montré une implication des BSR dans la dégradation des hydrocarbures. L'utilisation conjointe des technique moléculaires et culturales pourrait nous permettre d'accéder par la suite aux capacités de dégradation des souches isolées sur le site contaminé. et de mieux appréhender la dynamique des communautés hydrocarbonoclastes au sein du tapis.

- CHAPITRE V -

**DIVERSITE ET STRUCTURE DES
MICROORGANISMES FIXATEURS DE
CARBONE AU SEIN DU TAPIS MICROBIEN**

CHAPITRE V : DIVERSITE ET STRUCTURE DES MICROORGANISMES FIXATEURS DE CARBONE AU SEIN DU TAPIS MICROBIEN

1. INTRODUCTION

Les chapitres précédents nous ont permis d'examiner l'importante diversité microbienne et les différentes voies métaboliques présentes au sein des tapis microbiens notamment celles impliquées dans le cycle du soufre. Ce dernier chapitre s'intéresse aux deux autres principaux cycles biogéochimiques présents dans les tapis microbiens. Dans un premier temps, pour examiner le potentiel métabolique des voies impliquées dans le cycle du carbone et de l'azote nous avons quantifié des marqueurs fonctionnels de ces voies métaboliques. De par l'importance des organismes fixateurs de carbone présents dans les tapis, notamment les photosynthétiques comme nous avons pu le voir dans le premier chapitre, nous développerons plus en détail les marqueurs de la fixation du carbone.

De nombreux microorganismes sont capables de fixer le carbone au sein des tapis microbiens, on dénombre parmi eux des phototrophes oxygéniques et anoxygéniques et des chimiolithotrophes. Bien que ces microorganismes aient développé plusieurs mécanismes biochimiques de fixation du CO₂, le plus répandu est le cycle de Calvin. La ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase initie le cycle de Calvin. Cette enzyme est présente sous plusieurs formes qui possèdent des structures, des activités catalytiques et des sensibilités à l'oxygène différentes. La forme I de la RuBisCO est divisée en deux types, le type « green-like » et le type « red-like ». La première se retrouve chez les *Cyanobacteria*, les algues vertes et les plantes et chez les *Alpha-*, *Beta-* et *Gammaproteobacteria*. Le type « red-like » est retrouvé chez des algues non vertes ainsi que chez des *Alpha-* et *Betaproteobacteria*. La forme I de la RuBisCO est prédominante chez les organismes photosynthétiques et chez les chimiolithoautotrophes aérobies (Elsaied & Naganuma, 2001) alors que la forme II est plus présente chez les organismes fixant le carbone en anaérobiose tels que la bactérie pourpre non sulfureuse *Rhodospirillum rubrum* (Tabita, 1995). Cette forme est retrouvée chez des *Proteobacteria* et chez des algues dinoflagellés. Dans cette étude, nous avons ciblé de façon spécifique le gène de la RuBisCO des procaryotes par PCR et séquençage haut débit afin de déterminer la diversité et la structure des microorganismes possédant un potentiel de fixation de carbone dans les tapis microbiens décrits dans le chapitre III. Pour prendre en compte les variations saisonnières l'étude porte sur deux tapis microbiens au cours de quatre campagnes : deux au printemps et deux autres en automne.

2. RESULTATS

2.1. Abondance des marqueurs fonctionnels impliqués dans le cycle de l'azote et du carbone

Afin de cibler les microorganismes impliqués dans les cycles biogéochimiques de l'azote et du carbone, des marqueurs moléculaires ont été utilisés. Parmi ceux impliqués dans le cycle de l'azote, seul celui de la fixation de l'azote a pu être amplifié, ceux ciblant la dénitrification (*narG*, *nirS*, *nirK* et *nosZ*) ou la nitrification (*amoA*) n'ont pas permis d'amplifier le gène ou donnaient des amplifications non spécifiques. Une abondance de $5,13 \cdot 10^9$ à $1,36 \cdot 10^{10}$ copies par gramme de sédiments sec a été observée pour les gènes codant pour la nitrogénase (Figure V-1), cette abondance n'était pas significativement différentes entre les échantillons selon le test de tukey HSD.

Parmi les gènes impliqués dans le cycle du carbone, le gène *mcrA* codant pour la méthyl-coenzyme M réductase intervenant dans la méthanogénèse n'a pas pu être quantifié pour les échantillons de la dernière campagne de EDB1, l'abondance du gène était inférieur au seuil de quantification. Par ailleurs l'abondance de ce gène était significativement plus élevée en C2, dans ce tapis. La fixation du carbone a été ciblé au travers du gène de la RuBisCO, la forme I « red-like » de la RuBisCO n'était pas assez abondante pour permettre sa quantification, en revanche la forme I « green-like » et la forme II ont pu être quantifiées au travers des gènes *cbbL-GL* et *cbbM* respectivement. L'abondance du gène *cbbM* était trop faible en EDB1 C3 pour être quantifiée, l'abondance dans les autres échantillons est comparable à part pour EDB1 C0 qui était significativement plus faible que C1. Le gène *cbbLGL* a pu être quantifié pour l'échantillon EDB1 C3, mais présente une abondance plus faible. L'abondance du gène *cbbLGL* est globalement plus importante que celle du gène *cbbM*.

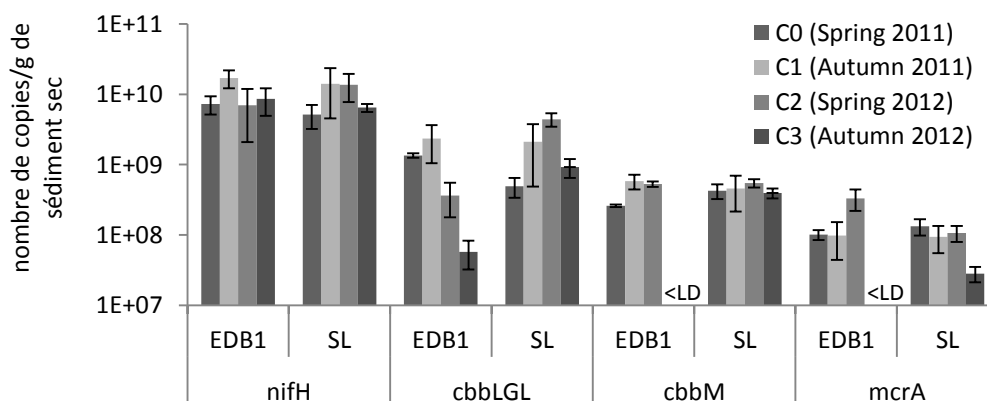


Figure V-1: Abondances des gènes *nifH*, *cbbLGL*, *cbbM* et *mcrA* données en nombre de copies par gramme de sédiments sec de chaque site. <LD : inférieur à la limite de détection.

2.2. Diversité des gènes de la RuBisCO

La diversité des communautés de microorganismes fixateur de carbone a été examinée au travers des gènes *cbbL* « green-like » et *cbbM* (Table V-1). Un minimum de 13 539 séquences après nettoyage a été obtenu par réplicata pour CbbLGL et 22 464 pour CbbM. Les séquences peptidiques identiques ont été regroupées en OTU (van der Wielen, 2006) correspondant aux 90% d'identité en acide nucléique (Elsaied & Naganuma, 2001), valeur utilisée dans de précédentes études (Kong *et al.*, 2012; Nakai *et al.*, 2012). 28521 OTU ont été définis pour CbbM et 13061 pour CbbL-GL. Les indices de Shannon et Simpson ont ensuite été calculés à partir de ces OTU. Une diversité plus élevée était observable pour la forme II de la RuBisCO. Aucune tendance saisonnière n'a pu être mise en évidence au travers des indices de diversité mesurés.

Table V-1 : Indices de diversité et de richesse des gènes *cbbL* et *cbbM* obtenus à partir des OTU définis à 100% d'identités en acides aminés

Echantillons	<i>cbbL</i>			<i>cbbM</i>		
	Sobs	Simpson	Shannon	Sobs	Simpson	Shannon
EDB1 C0	4111	0,123	4,236	5720	0,033	5,568
EDB1 C1	1849	0,121	3,891	4719	0,050	5,038
EDB1 C2	3488	0,077	4,570	4716	0,064	4,884
EDB1 C3	2229	0,060	4,478	ND	ND	ND
SL C0	2406	0,205	3,838	6626	0,030	5,655
SL C1	2181	0,072	4,393	7097	0,025	5,690
SL C2	2262	0,083	4,407	8062	0,022	5,817
SL C3	2748	0,038	5,009	3877	0,045	5,173

Les mesures de distance de Bray Curtis ont été calculées à partir des tables d'OTU des séquences peptidiques des gènes *cbbLGL* et *cbbM*. Des clusters ont ensuite été réalisés à partir de ces distances en utilisant la méthode de Ward (Figure V-2). On observe un regroupement entre sites pour les deux gènes. Au sein des sites, on observe un regroupement des échantillons de printemps pour le bassin de rétention avec la forme I de la RuBisCO et à l'inverse pour la forme II on observe un regroupement entre saisons pour le site SL. Seulement 185 OTUs de CbbM sont communs aux 7 échantillons (moins de 1% des OTUs retrouvés) représentant 20,82% à 46,38% des séquences. Pour les OTU de CbbL-GL seul 53 OTUs sont communs aux 8 conditions. L'échantillon EDB1 est particulièrement divergeant, il ne partage que 20,43% de ses séquences avec les autres échantillons, qui eux partagent de 42,61% à 63,87% des séquences.

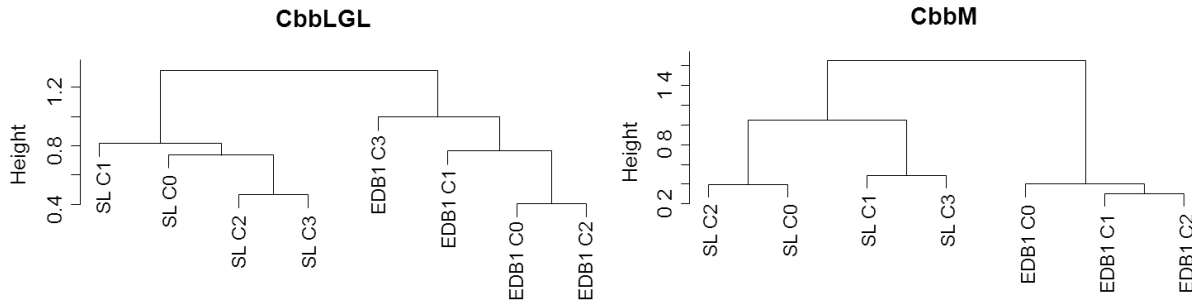


Figure V-2: Cluster des OTUs des séquences peptidiques de CbbLGL et CbbM selon la distance de Bray Curtis.

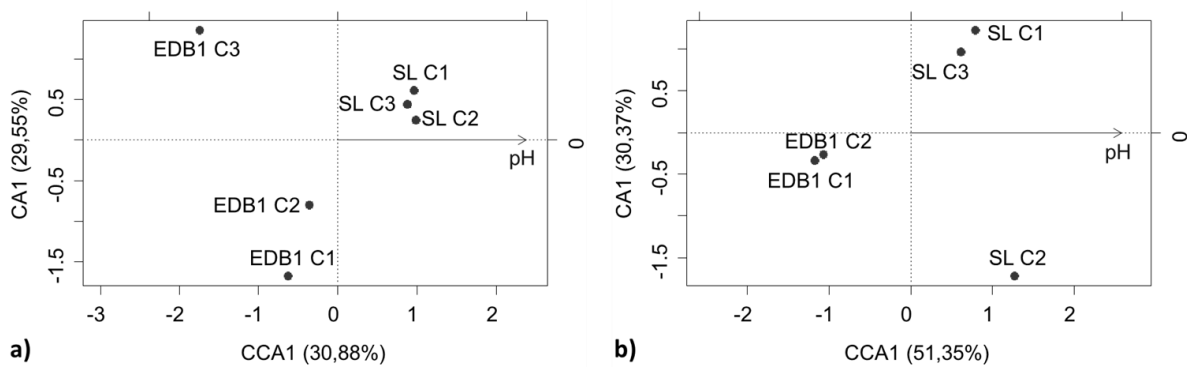


Figure V-3: Analyses canoniques de correspondance (CCA) parcimonieuse montrant l'influence du pH sur la distribution des communautés de CbbL-GL (a) et CbbM (b).

L'influence des paramètres environnementaux naturels a été testée sur nos communautés par des analyses canoniques de correspondance (CCA) parcimonieuse pour les campagnes de C1 à C3 (Figure V-3), étant donné que les valeurs pour la première campagne (C0) sont manquantes. Pour les deux formes de la RuBisCO seul le pH avait une influence significative sur la distribution de nos communautés, les communautés du site SL étant caractérisées par un pH plus élevé.

Des arbres phylogénétiques regroupant les 50 OTU les plus abondants ont été réalisés en parallèle d'une heatmap, ces 50 OTU représentent 60 à 71% des séquences pour CbbLGL et 49 à 61% des séquences de CbbM.

2.3. Affiliation phylogénétique de la forme I « green-like » de la RuBisCO

Les séquences d'acides aminés de CbbL-GL d'organismes appartenant aux classes des *Gamma-* et *Betaproteobacteria* ne sont pas monophylétiques (Figure V-4). La phylogénie des séquences affiliées aux *Cyanobacteria* semble en revanche mieux conservée. Parmi les séquences affiliés à des sulfo-oxydantes, le site SL présente une plus forte abondance

d'*Hydrogenophylaceae* représentées notamment par l'OTU 65 affilié à 98% à *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259. Le cluster regroupant les OTU affiliés aux *Chromatiaceae* (OTU 1804, 70 50 et 173), des bactéries photosynthétiques pourpre sulfureuses, représente moins de 2,27% de l'abondance relative en EDB1 alors qu'il représente jusqu'à 8,09% en SL. L'OTU 5 dont le plus proche parent est une bactérie sulfo-oxydante incolore *Thiothrix nivea* avec 96% d'identité est abondant sur les deux tapis microbiens, avec un maximum sur le site SL avec 44,81% des séquences en C0. Cet OTU est par ailleurs plus abondant au printemps. L'OTU 121 particulièrement plus abondant sur EDB1 est également plus abondant au printemps, son plus proche parent est une *Gammaproteobacteria* sulfo-oxydante symbiote du bivalve *Solemya velum*. Les OTU 153, 109, 41, 389 et 215 également affiliés à des *Gammaproteobacteria* dont les plus proches parents sont des sulfo-oxydantes incolores présente des abondances plus élevées sur les campagnes de printemps pour les deux sites. Globalement une forte dominance des séquences affiliées aux *Gammaproteobacteria* sulfo-oxydantes est observée au printemps. Par opposition, l'abondance relative des cyanobactéries augmente en automne bien que les OTU dominants varient. Ainsi l'OTU 189 affilié à 99% à la *Stigonematales Fischerella* représente 28,17% des séquences de la première campagne d'automne alors qu'elle représente moins de 2% pour les autres. De même pour l'OTU 124 affiliée à la *Nostocales Scytonema* (96%) un pic d'abondance est observable représentant 14,28% des séquences. Pour la seconde campagne d'automne ce sont les OTU 271, 911, 183 affiliés à *Synechococcus* qui présentent des pics d'abondance. Pour le site SL l'OTU 280 dont le plus proche parent est *Scytonema bohnerii* domine la communauté automnale des cyanobactéries. Globalement en considérant uniquement ces 50 OTU dominants, la communauté *Cyanobacteria* représente 43,09 et 48,82% de l'abondance relative du gène *cbbL* en automne pour 3,22 et 14,15% de l'abondance aux campagnes de printemps. De la même façon pour SL les OTU dominants affiliés aux cyanobactéries représentent 15,45 et 35,43% de l'abondance en automne pour seulement 2,78 et 7,05% au printemps.

Enfin, le cluster regroupant les OTU 340, 587, 459, 244 et 141 présente une paraphylie, il regroupe à la fois des représentants des *Alphaproteobacteria*, des *Actinobacteria* et des *Verrucomicrobia*. Parmi ces OTU ceux proche des *Verrucomicrobia* sont plus abondants sur SL.

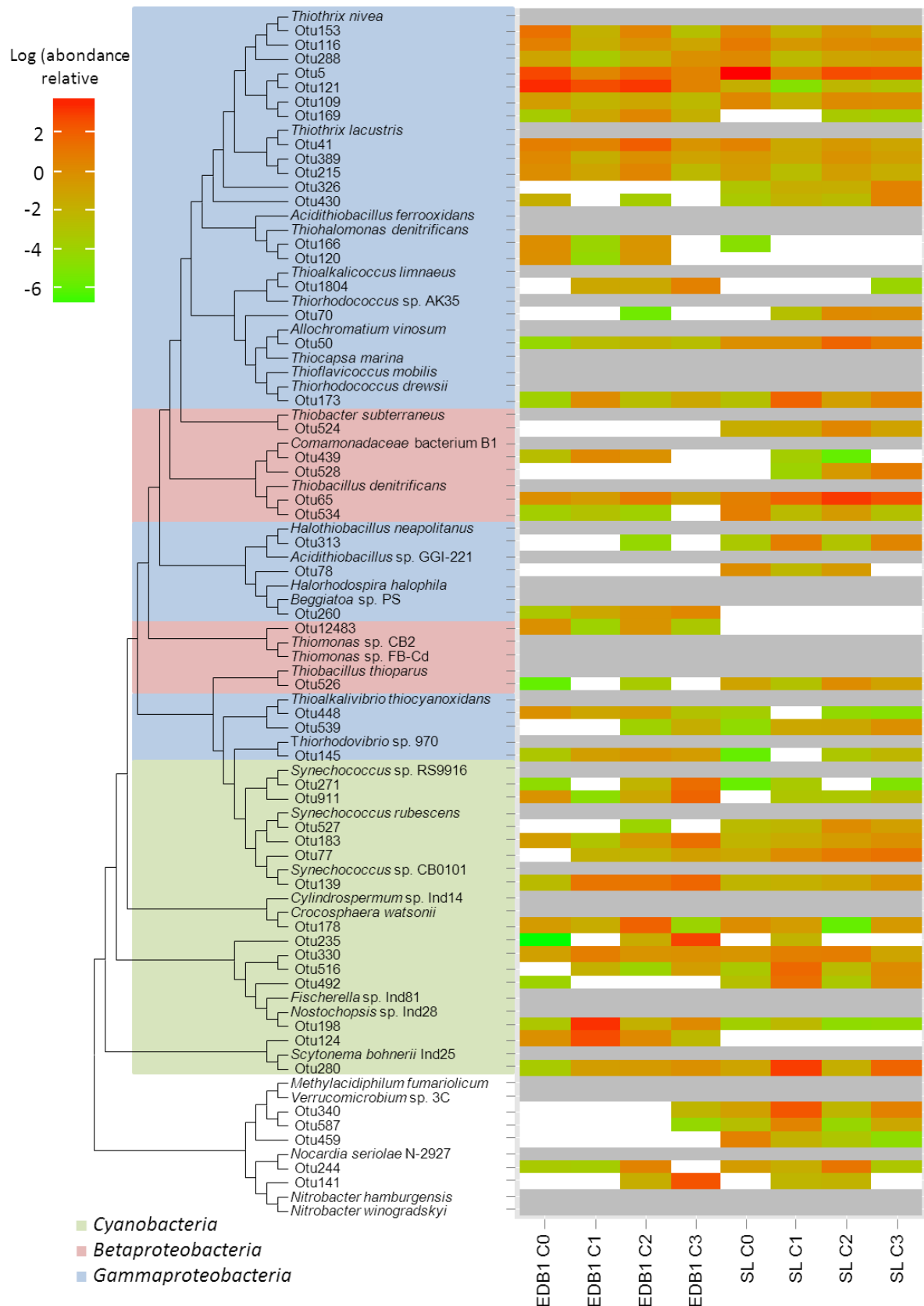


Figure V-4: Arbre phylogénétique des séquences de référence des OTUs les plus abondants affiliés au gène *cbbLGL* « green-like » avec leurs plus proches parents cultivables. Leurs abondances sont représentées par un heatmap. L'arbre phylogénétique a été généré avec l'algorithme du neighbor joining avec 1000 répétitions de bootstrap.

2.4. Affiliation phylogénétique de la forme II de la RuBisCO.

L'arbre phylogénétique réalisé avec les 50 OTU dominants de la forme II de la RuBisCO regroupe principalement des bactéries sulfo-oxydantes (Figure V-5). Parmi elles se retrouvent des bactéries phototrophes pourpres non sulfureuses classées au sein des *Alphaproteobacteria* et regroupées au sein du cluster comprenant les souches de références affiliées aux genres *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Rhodopseudomonas* et *Phaeospirillum*. Un autre cluster affilié à la famille des *Rhodospirillaceae* au sein des *Alphaproteobacteria* regroupent également quatre OTU de phototrophes non sulfureuses, ceux proches du genre *Magnetospira* sont plus abondant sur SL et présentent également des abondances relatives plus importantes en automne. Des clusters non monophylétiques regroupant à la fois des phototrophes pourpres sulfureuses affiliées au genre *Lamprobacter* ou *Thiodictyon* et des sulfo-oxydantes incolores affiliées au genre *Thiothrix* comportent des OTU plus abondants au printemps sur le site SL, ceci est particulièrement visible pour l'OTU 6575 qui présente des pics d'abondance sur le site SL au printemps représentant jusqu'à 9,4% de l'abondance relative et pour l'OTU 12 389 dont le plus proche parent est le genre *Thioalkalicoccus* (96,33%) représentant jusqu'à 11,93% de l'abondance sur les campagne de printemps de SL. Par oppositions au sein de ce cluster on observe l'OTU 12572 qui est plus abondant en automne. Parmi les sulfo-oxydantes incolores le genre *Thiomicrospira* est très représenté sur les deux sites, les OTU 14417, 12406 et 12 496 y sont affiliés. L'OTU 12573, dont le plus proche parent est *Thiobacillus denitrificans* (89,9%), est spécifique à EDB1, il y est très abondant sur les trois campagnes, représentant 14,65 à 18,46% des séquences.

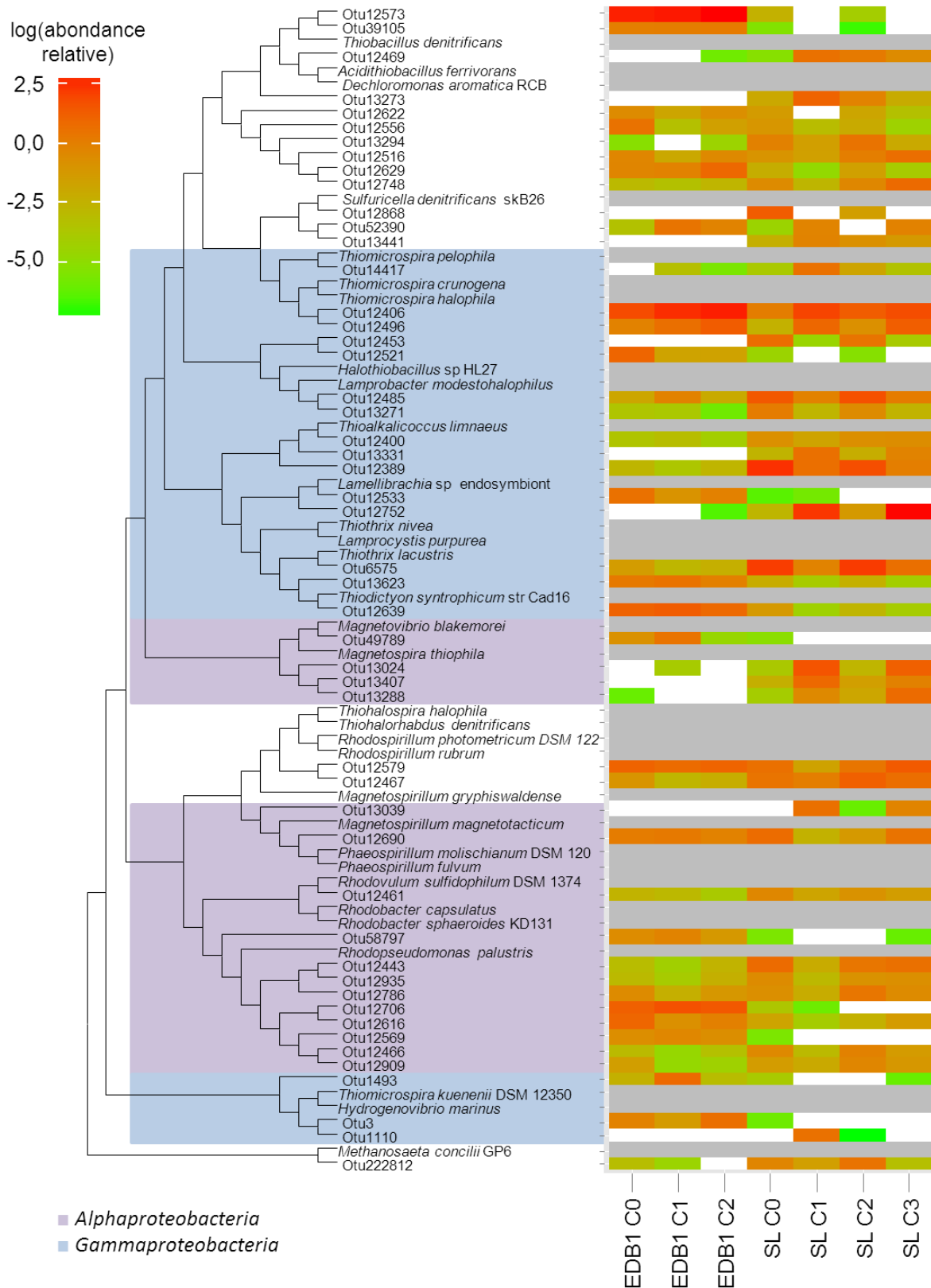


Figure V-5 : Arbre phylogénétique des séquences de références des 50 OTUs les plus abondants affiliés au gène *cbmM* avec leurs abondances relatives représentées par un heatmap. L'arbre phylogénétique a été calculé avec l'algorithme du neighbor joining avec 1000 répétitions de bootstrap.

3. DISCUSSION

Ce dernier chapitre vise à compléter la description des tapis microbiens et des cycles biogéochimiques présents au sein de ces tapis au travers de marqueurs fonctionnels ciblant des métabolismes impliqués dans la fixation de l'azote et du carbone. Les tapis microbiens sont des systèmes relativement clos en termes de fixation de carbone et de fixation d'azote pour la production de biomasse. Les marqueurs fonctionnels impliqués dans le cycle de l'azote ont montré une faible abondance des communautés de dénitrifiantes et nitrifiantes, ce qui confirme de précédentes observations qui les donnaient comme numériquement moins importantes au sein des tapis microbiens (van Gemerden, 1993). En revanche, on observe une forte abondance des communautés fixatrices d'azote, qui étaient d'après le chapitre IV principalement imputée à des sulfato-réducteurs et à des *Cyanobacteria*. La quantification du marqueur fonctionnel impliqué dans la fixation d'azote n'a pas montré de différences significatives dans le potentiel de fixation d'azote ; cependant la diversité de ce gène reste à déterminer dans les deux sites et selon les saisons par les données de séquençage systématique.

Deux métabolismes associés au cycle du carbone ont été étudiés, la méthanogénèse *via* le gène *mcrA* et la fixation du CO₂ *via* l'étude de la RuBisCO. Les gènes *mcrA* étaient abondants sur les deux sites, sauf pour la dernière campagne de EDB1. Cela suggère un potentiel de méthanogénèse important dans les tapis microbiens. L'analyse de la diversité de la communauté microbienne par l'approche 16S (voir chapitre III) a permis par ailleurs de mettre en avant une dominance des méthanogènes dans la communauté *Archaea* principalement affiliées aux *Methanomicrobia*, *Methanococci* et *Methanobacteria*. Enfin les gènes ciblant la fixation du carbone utilisés dans cette étude comme marqueurs étaient abondants confirmant la forte capacité des tapis à produire de la biomasse. Leurs activités pourront être par la suite estimées par le biais du séquençage systématique des transcrits (chapitre III). Les diversités des gènes de la RuBisCO de la forme I « green-like » et de la forme II ont été examinées par PCR et séquençage haut débit, et à notre connaissance il s'agit là de la première étude utilisant cette technique pour examiner la diversité des gènes de la RuBisCO. Un nombre d'OTU très élevé a été obtenu par cette technique, la forte stringence du traitement de séquences nous permet de conclure que cette étonnante diversité ne provient pas d'erreurs de séquençage. Une plus forte diversité a été observé pour CbbM comme observé par ailleurs (Xiao *et al.*, 2014). Parmi les paramètres environnementaux testés, seul le pH influence significativement les communautés fixatrices de carbone et ceci pour les deux

formes de la RuBisCO. Le pH est connu pour affecter la disponibilité des nutriments pour les microorganismes (Zhang *et al.*, 2012), il influence également la solubilité et l'ionisation du CO₂ et interfère avec les mécanismes de concentration du CO₂ des organismes autotrophe sous de faibles concentrations en CO₂ (Hopkinson *et al.*, 2011). Il a par ailleurs été observé un lien entre la diversité des gènes de la RuBisCO et du pH (Xiao *et al.*, 2014).

Les séquences de la forme I de la RuBisCO sont principalement affiliées pour les deux tapis microbiens à des cyanobactéries et à des bactéries sulfo-oxydantes photo- et chimio-autotrophes affiliées aux *Gammaproteobacteria*. Un effet saison est observable au travers de l'abondance des groupes fonctionnels ; l'abondance relative des bactéries sulfo-oxydantes incolores augmente au printemps. En revanche, en automne, une plus forte abondance de cyanobactéries est observée. Les analyses en clusters n'ont pas permis une claire séparation des données en fonction des saisons lors de l'étude des gènes de la forme I de la RuBisCO bien que des variations saisonnières aient été observées pour des organismes phototrophes anoxygéniques *via* le gène *pufM* (voir chapitre IV). Les OTUs dominants affiliés aux cyanobactéries varient d'une campagne à l'autre et ne sont pas attribués aux mêmes OTUs, on observe ici une redondance fonctionnelle.

La plupart des séquences du gène *cbbM* sont affiliées à des sulfo-oxydantes chimio- ou photo-autotrophes confirmant l'importance du cycle du soufre dans les tapis microbiens notamment dans la partie anoxique. étant donné que CbbM fonctionne sous de faibles concentrations d'O₂ et est présente chez les chimioautotrophes anaérobies et aérobies facultatives (Tourova *et al.*, 2006). Certains OTUs très abondants sont communs aux deux tapis. Cependant, une variation saisonnière est observable uniquement sur SL. Parmi les bactéries présentant une variation saisonnière sur le site non contaminé sont observées des *Rhodospirillaceae* sulfo-oxydantes et des *Gammaproteobacteria*. Certaines espèces impliquées dans la variation saisonnière ne peuvent cependant pas être affiliées au-delà de la classe à cause du manque de séquences de références disponibles dans les bases de données publiques, mais aussi des échanges horizontaux conduisant à des clusters non monophylétiques. Les OTUs dominants pour CbbM du site contaminé présentaient au contraire une stabilité dans le temps.

La dominance des phototrophes pourpres sulfureuses et des sulfo-oxydantes incolores dans les fixateur de carbone montre ici que les cycles biogéochimiques du carbone et du soufre sont étroitement liés, il en va de même pour celui de l'azote de par l'implication des cyanobactéries et des BSR dans la fixation de l'azote. Les tapis microbiens semblent

particulièrement inférés aux cycles saisonniers en particulier pour les organismes photosynthétiques. Les *Cyanobacteria* dominent la communauté automnale de fixateurs de carbone et sont en partie remplacées au printemps par les chimiolithotrophes sulfo-oxydantes.

- CHAPITRE VI -
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ubiquitaires et très anciens, les communautés des tapis microbiens font preuve de capacités métaboliques et adaptatives très importantes. Situés en zones côtières, ces écosystèmes peuvent être soumis à des contaminations pétrolières. Dans ce contexte, cette étude vise à décrire la structure et le fonctionnement de tapis microbiens et à comprendre l'impact d'une contamination pétrolière sur ces écosystèmes. Cette étude s'est portée sur deux tapis microbiens de l'étang de Berre aux paramètres physico-chimiques proches mais présentant des niveaux de contaminations pétrolières contrastés. La difficulté de travailler dans des écosystèmes naturels est d'arriver à extraire le rôle d'un paramètre par rapport aux autres. Dans ce but, les études sont généralement réalisées *in vitro*, avec les limites caractéristiques de ce type d'approche (effet bouteille principalement). Dans cette étude, les échantillons ont été sélectionnés pour que la contamination soit la principale différence caractérisant les tapis microbiens. Même ainsi, le fonctionnement du système étant tributaire d'autres facteurs tels que la lumière et les saisons, les variations saisonnières et nyctémérales ont donc été prises en compte : Quatre échantillonnages répartis sur deux saisons ont ainsi été réalisés avec une campagne comportant des prélèvements jour/nuit.

Afin de comprendre l'effet du pétrole sur la structure et le métabolisme des populations microbiennes, nous avons exploré les communautés bactériennes et archéennes présentes et actives dans les tapis microbiens ainsi que leurs métabolismes associés. Les deux tapis microbiens étaient colonisés principalement par des organismes affiliés aux *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* et *Bacteroidetes* comme décrit dans d'autres tapis (Bolhuis & Stal, 2011; Severin & Stal, 2010) avec une très forte diversité en accord avec de précédentes études qui classent les tapis parmi les écosystèmes marins les plus diversifiés. Les deux tapis microbiens présentaient cependant des structures différentes, la séparation spatiale prévalait sur la séparation saisonnière. La fraction active de la communauté présentait une différence encore plus marquée, celle du site contaminé présentait une évolution linéaire tandis que celle du site témoin suivait les variations saisonnières. Malgré ces structures de communautés différentes, des profils métaboliques très semblables étaient observables, avec des fonctions similaires laissant supposer une redondance fonctionnelle. Les tapis microbiens sont considérés des écosystèmes robustes au sein desquels les différents groupes bactériens interagissent entre eux. Le pétrole modifierait donc la structure de la communauté mais les fonctions métaboliques dominantes seraient conservées au sein de la communauté par un

équilibre entre les différents microorganismes présents. De fait, les analyses biogéochimiques des activités liées aux grands groupes fonctionnels tels que la respiration, photosynthèse, sulfato-réduction, etc, n'ont pas montré de différences particulièrement importantes. Pour préciser les résultats obtenus, il serait intéressant de comparer les profils métaboliques de tapis microbiens côtiers ayant différentes caractéristiques environnementales comme la salinité ou d'autres paramètres forçant afin de confirmer si les profils métaboliques sont conservés malgré les variations environnementales. Dans le cas où effectivement des facteurs environnementaux, bien connus pour déterminer des différences de structure dans les communautés, tels que la salinité (Lozupone & Knight, 2007) induiraient une modification de structure de métabolisme, cela indiquerait que le pétrole n'est pas un facteur forçant dans le fonctionnement du système. Mais les paramètres qui ont été considérés jusqu'à maintenant comme forçants ont été déterminés à travers des études de structure et non de métabolisme. On peut se poser la question si une différence de structure d'une communauté affecte en quelque chose le fonctionnement de celle-ci ?

Malgré des profils métaboliques très similaires entre les communautés, celle du site contaminé montrait de nombreux gènes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures significativement plus exprimés sur le site contaminé. Ces gènes ne représentaient cependant qu'une fraction mineure des gènes exprimés dans les tapis microbiens. La composition en hydrocarbures du site contaminé témoignait par ailleurs d'une évolution dans sa composition avec une diminution des hydrocarbures plus facilement dégradables dans le temps, attestant d'un processus de dégradation des hydrocarbures. Cette augmentation de la teneur en hydrocarbures aromatiques rejoint le schéma généralement observé lors des pollutions pétrolières avec une diminution des composés de faibles poids moléculaires dans les premiers temps et une dégradation des hydrocarbures aromatiques et des hauts poids moléculaires plus tardive (Figure VI-1) (Head *et al.*, 2006). Cette capacité de dégradation sur le site EDB1 avait déjà été suggérée par Paissé *et al.*, (2008) lors de l'analyse de certains indices de biodégradation (ratio nC17/pristane). Ces observations étayent de précédentes études qui ont montré la capacité de dégradation des tapis microbiens (Abed & Köster, 2005; Bordenave *et al.*, 2004; Grötzschel *et al.*, 2002; Raghukumar *et al.*, 2001). La dégradation abiotique, tels que la photo-oxydation, est très limitée dans les tapis puisqu'il protège les hydrocarbures (de Oteyza *et al.*, 2006) en les piégeant sous la surface des sédiments. De plus, la modification de la composition en hydrocarbure s'est accompagnée d'une diminution du taux d'expression des gènes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures, ce qui semblerait confirmer que des

dégradations biotiques aient bien eu lieu. Ces gènes de dégradation codaient à la fois pour des gènes de dégradation d'hydrocarbures aliphatiques (alcane 1-monooxygénase) et aromatiques (toluène monooxygénase et l'éthylbenzène dioxygénase) mais également des gènes impliqués dans la dégradation anaérobie (benzylsuccinate synthase et une possible alkylsuccinate synthase) suggérant l'implication de la partie oxic et anoxie du tapis dans la dégradation des hydrocarbures. Les BSR sont les principaux dégradeurs de la phase anoxique du tapis. Les cultures de BSR hydrocarbonoclastes qui ont été réalisées en parallèle dans le projet Funhymat pourraient nous permettre de caractériser des souches capables de dégrader les hydrocarbures. Ceci dans le but de mieux appréhender la dynamique des communautés hydrocarbonoclastes au sein du tapis et, enfin, d'essayer de mettre en avant de nouvelles voies métaboliques de dégradation, mécanismes qui sont à l'heure actuelle, mal connus et nécessitent un effort de recherche. La dégradation réalisée par des bactéries aérobies est au contraire bien étudiée. Certaines bactéries hydrocarbonoclastes, notamment *Cycloclasticus*, ont été observées plus abondantes et plus actives sur le site contaminé, cependant elles ne représentaient qu'une part mineure de la communauté active. *Cycloclasticus* est connue pour avoir un rôle dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques en milieu marin. Elle apparaît plus tardivement sur une contamination après que la plupart des alcanes aient été dégradés (Figure VI 1) (Head *et al.*, 2006). Ces observations soutiennent l'hypothèse que le tapis microbien du site contaminé bien que partageant un profil métabolique proche du site moins contaminé soit adapté à la contamination en hydrocarbure. Cette capacité d'adaptation témoigne d'une pollution ancienne, la communauté microbienne est capable de faire face à la contamination par l'expression de gènes impliqués dans les métabolismes de dégradations des hydrocarbures. Le site non contaminé a également montré des gènes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures ainsi que la présence de bactéries hydrocarbonoclastes. Ils étaient cependant faiblement abondants et peu ou pas exprimés. L'Etang de Berre est une lagune qui reçoit des contaminations depuis le début du 20^{ème} siècle, la notion d'un site non contaminé est difficile à considérer. Le site SL, utilisé dans cette étude comme site témoin pour la contamination pétrolière, n'est évidemment pas un site vierge, si tant soit-il qu'on puisse considérer qu'il existe encore un site vierge de toute contamination anthropique. Nous ne pouvons pas éliminer la possibilité d'une faible contamination ponctuelle liée aux activités humaines présentes autour de l'étang de Berre qui ait sélectionné les organismes capables de dégradation. Néanmoins, la différence en hydrocarbures pétroliers étant très importante entre les deux sites, l'hypothèse d'une sélection équivalente entre les deux sites semble hasardeuse.

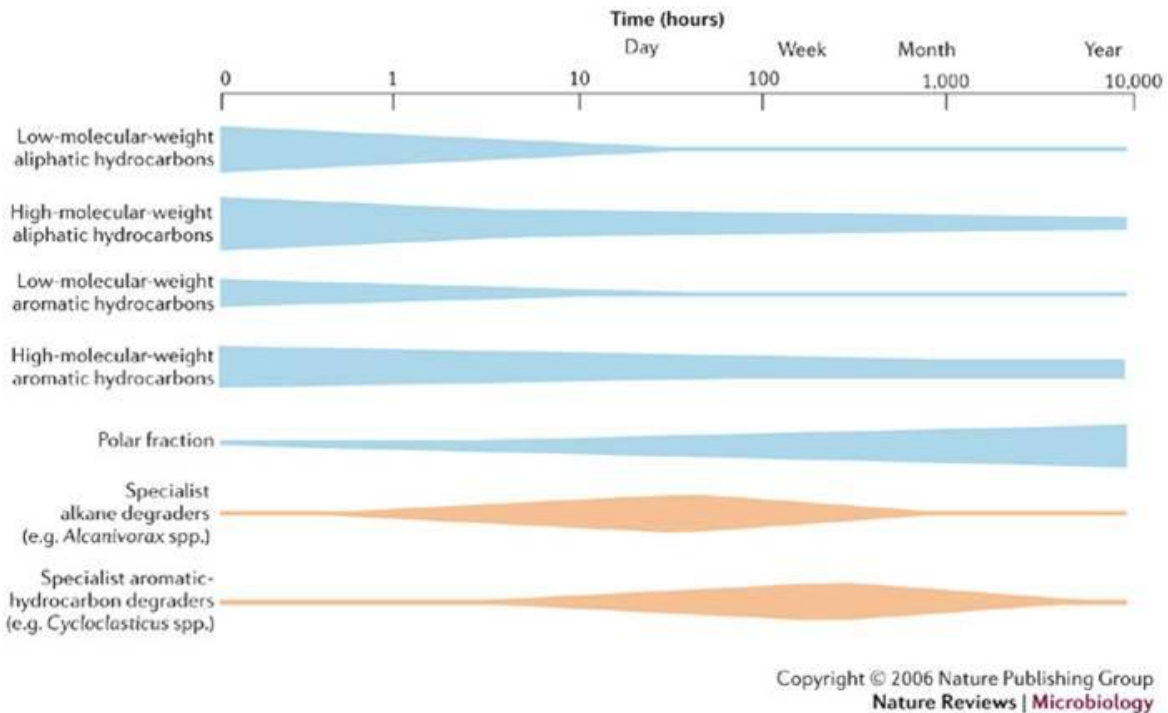


Figure VI-1: Observation des changements de la composition d'un pétrole et de l'abondance des organismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures en fonction du temps suite à une contamination pétrolière (Head *et al.*, 2006)

La structure du tapis contaminé a montré une évolution au cours des campagnes de prélèvement avec une modification profonde lors de la dernière campagne, caractérisée par une forte abondance de cyanobactéries présentes et actives. Cette modification était visible à simple vue, puisque le tapis était plus solide que lors de prélèvements précédents. Ce dernier prélèvement fait suite notamment à l'arrêt d'activité de la raffinerie et donc à la diminution des apports en polluants. Cette modification pourrait faire état d'une résilience du tapis. Il a en effet été observé dans des études précédentes une recolonisation des cyanobactéries après une contamination pétrolière (Sorkhoh *et al.*, 1992). Un plus long suivi dans le temps serait cependant nécessaire pour confirmer cette hypothèse, et permettrait d'apporter une information inédite sur la résilience d'un tapis microbiens *in situ* suite à une pollution chronique sur une longue période. Si effectivement nous sommes en présence d'un système en résilience, donc, non encore stable, ça voudrait dire que les deux tapis étudiés sont différents, avec le tapis contaminé plus solide et avec beaucoup plus de cyanobactéries que le tapis du site non contaminé. Ce tapis par contre, montre des modifications saisonnières plus marquées, indiquant une certaine annualité du système.

Relativement peu d'études se sont intéressées à l'effet des variations saisonnières sur la structure des tapis microbiens. En présence de contamination pétrolière, l'effet de la variation saisonnière est moins remarquable, la pollution pétrolière semble apparaître comme un paramètre forçant sur les communautés des tapis microbiens diminuant l'effet des variations saisonnières. La communauté du site témoin présentait une plus forte abondance et activité de phototrophes oxygéniques en fin d'été, début d'automne, cette période est d'ailleurs connue pour être caractérisée par des blooms de phototrophes. Au printemps en revanche, une plus forte abondance de bactéries associées au cycle du soufre et de méthanogènes était visible. Cette observation a été confirmée par l'analyse différentielle montrant des gènes impliqués dans le cycle du méthane plus actif au printemps tandis que d'autres liés à la photosynthèse étaient plus exprimés en automne. Cette tendance s'est d'ailleurs retrouvée au travers des différents marqueurs fonctionnels qui ont été utilisés, les marqueurs ciblant la fixation du carbone via la forme I de la RuBisCO ont confirmés l'observation d'une plus forte abondance de cyanobactéries en automne. Il a été également été observé au printemps une abondance de bactéries sulfo-oxydantes chimiotrophes. Les marqueurs ciblant les BSR ont également témoigné de variations saisonnières, l'abondance relative des *Desulfobulbaceae* était plus importante au printemps, la variation de la salinité et de la concentration en sulfate pourrait être à l'origine de cette modification mais un prélèvement ponctuel ne permet pas de confirmer cette hypothèse. Il faudrait pour cela un suivi plus régulier ou des campagnes réalisées sur du plus long terme afin de lier les données de diversité avec celles des paramètres environnementaux pour comprendre les facteurs influençant cette modification de structure.

Un dernier aspect enfin a été étudié dans cette thèse, concernant la différence de fonctionnement des tapis en présence ou absence de lumière. Ce paramètre a été interprété dans l'étude des sulfato-réducteurs dans une campagne, montrant une variation liée aux cycles nycthémeraux, pouvant être notamment liée aux modifications du gradient d'oxygène. Ces communautés jusqu'aux années 1990 étaient considérées comme strictement anaérobies. Cependant depuis, des études ont montré que certaines étaient tolérantes à l'oxygène par des différents mécanismes de détoxification, d'agrégation ou de migrations vers les zones anaérobies (Coulter & Kurtz, 2001; Dolla *et al.*, 2006; Lombard *et al.*, 2000), certaines sont même capables de respirer l'oxygène, telle que la souche *Desulfobulbus propionicus* (Dilling & Cypionka, 1990). Une plus forte activité des *Desulfobulbaceae* était observable en journée pour les deux sites, pouvant laisser supposer une meilleure tolérance à l'oxygène de ces

organismes. Les techniques d'isolement de souches qui ont été réalisées en parallèle pourront nous permettre par la suite de tester cette hypothèse de tolérance à l'oxygène pour les 84 isolats affiliés aux *Desulfobulbaceae* que nous avons obtenu. D'autant plus que cette famille est dominante au sein de nos isolats alors qu'elle ne l'est pas au travers des méthodes moléculaires laissant penser que ces souches pourraient être plus tolérantes au stress notamment oxygène généré lors de l'échantillonnage et de la mise en culture. Les différences observées pour les BSR doivent être étayées par l'analyse du métabolisme général du système lors des différentes saisons étudiées. Les autres groupes fonctionnels majeurs doivent être également explorés notamment les cyanobactéries, puisque la photosynthèse est dominante au sein des transcrits, il serait intéressant de comparer leurs structures et leur métabolisme jour/nuit.

En conclusion, le travail effectué au cours de cette thèse a permis de mettre en évidence une conservation des fonctions métaboliques dominantes au sein du tapis microbiens tout en présentant une adaptation (d'activité mais non pas de métabolisme) à la contamination pétrolière et une capacité de dégradation des hydrocarbures. L'étude à différents niveaux réalisée ici nous a permis d'obtenir différents points de vue de notre communauté, pour compléter l'image globale et s'affranchir ainsi au mieux des biais de chacune des techniques utilisées.

- ANNEXES -

ANNEXE 1.

Tableau des séquences des métagénomés alignées à la base de données KEGG à l'aide de l'aligneur last

DNA samples						
Sample ID	Sampling date	Campaing	Station	Raw reads	LAST hits	
					Total	Total %
26	25/09/2011	C1	EDB1	50564264	13176010	26,06%
28	25/09/2011	C1	EDB1	53911170	14114667	26,18%
29	25/09/2011	C1	EDB1	57164732	14715066	25,74%
96	25/09/2011	C1	SL	96311026	30010265	31,16%
97	25/09/2011	C1	SL	75954868	23707657	31,21%
98	25/09/2011	C1	SL	65523752	20927027	31,94%
130	16/04/2012	C2	SL	70700914	19598851	27,72%
131	16/04/2012	C2	SL	66849046	18613071	27,84%
132	16/04/2012	C2	SL	73608322	20200157	27,44%
170	16/04/2012	C2	EDB1	157625686	42290487	26,83%
171	16/04/2012	C2	EDB1	64009416	17103223	26,72%
172	16/04/2012	C2	EDB1	36834386	9919804	26,93%
303	25/09/2012	C3	EDB1	37361534	14514586	38,85%
304	25/09/2012	C3	EDB1	82721998	31989765	38,67%
305	25/09/2012	C3	EDB1	114975376	43782468	38,08%
325	25/09/2012	C3	SL	94766394	29926560	31,58%
326	25/09/2012	C3	SL	88924236	27025773	30,39%
327	25/09/2012	C3	SL	102693792	32046003	31,21%

Tableau des séquences des métatranscriptomes alignées à la base de données KEGG à l'aide de l'aligneur last

mRNA samples							
Sample ID	Sampling date	Campaing	Station	Period	Raw reads	LAST hits	
						Total	Total %
26	25/09/2011	C1	EDB1	Day	42851016	14230318	33,21%
28	25/09/2011	C1	EDB1	Day	43715348	14311050	32,74%
29	25/09/2011	C1	EDB1	Day	53263840	18421330	34,59%
96	25/09/2011	C1	SL	Day	38267858	13707147	35,82%
97	25/09/2011	C1	SL	Day	49019542	18688073	38,12%
98	25/09/2011	C1	SL	Day	36165464	12822250	35,45%
130	16/04/2012	C2	SL	Day	44986052	15099751	33,57%
131	16/04/2012	C2	SL	Day	38504110	13394779	34,79%
132	16/04/2012	C2	SL	Day	40693810	15999287	39,32%
170	16/04/2012	C2	EDB1	Day	41108730	14052118	34,18%
171	16/04/2012	C2	EDB1	Day	46483374	18121590	38,99%
172	16/04/2012	C2	EDB1	Day	36036486	13826596	38,37%
222	16/04/2012	C2	EDB1	Night	51072120	14707290	28,80%
223	16/04/2012	C2	EDB1	Night	49023236	16748036	34,16%
225	16/04/2012	C2	EDB1	Night	53672694	20914150	38,97%
270	16/04/2012	C2	SL	Night	41571330	14998869	36,08%
271	16/04/2012	C2	SL	Night	39789016	15297684	38,45%
272	16/04/2012	C2	SL	Night	49894686	19491564	39,07%
303	25/09/2012	C3	EDB1	Day	44981012	17996910	40,01%
304	25/09/2012	C3	EDB1	Day	14253934	6556918	46,00%
305	25/09/2012	C3	EDB1	Day	33613590	14432234	42,94%
325	25/09/2012	C3	SL	Day	44480896	14975288	33,67%
326	25/09/2012	C3	SL	Day	46274182	16577593	35,82%
327	25/09/2012	C3	SL	Day	40518768	13038281	32,18%
345	25/09/2012	C3	SL	Night	46203554	15014515	32,50%
346	25/09/2012	C3	SL	Night	36248252	12582701	34,71%
347	25/09/2012	C3	SL	Night	44749942	15340803	34,28%
364	25/09/2012	C3	EDB1	Night	32025666	11122874	34,73%
365	25/09/2012	C3	EDB1	Night	44744800	16103542	35,99%
366	25/09/2012	C3	EDB1	Night	31079856	11353706	36,53%

ANNEXE 2.

Composition des solutions utilisées pour la réalisation du milieu de culture pour l'isolement de suflato-réducteurs sur microplaque

Solution d'oligo-éléments SL12 (q.s.p. 1 L d'eau distillée) :

EDTA, 3,0 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,1 g ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 190 mg ; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mg ; ZnCl_2 , 42mg ; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24 mg ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 18 mg ; H_3BO_3 , 300 mg ; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg. La solution a été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes, puis stockée à l'obscurité.

Solution de vitamines V7 (q.s.p. 1 L d'eau distillée):

Biotine, 2 mg ; *p*-aminobenzoate, 10 mg, thiamine, 10 mg ; pantothénate, 5 mg ; pyrodoxamine, 50 mg, vitamine B12, 20 mg ; nicotinate, 20 mg. La solution a été stérilisée par filtration (membrane filtrante de porosité 0,2 μm) et stockée à l'obscurité.

Solution de sélénite tungstate (q.s.p. 1 L d'eau distillée):

NaOH , 0,4 g ; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6 mg ; Na_2WO_4 , 8 mg. La solution a été stérilisée à l'autoclave (120°C, 20 minutes).

ANNEXE 3.

Supplementary Information

Supplementary Methods and Results (Figures S1; S2; S3, Tables S1; S2)

for

Structure and functioning of sulfate-reducing communities in two contrastively hydrocarbon contaminated microbial mats characterized by polyphasic approaches

Johanne Aubé, Pavel Senin, Frederic Escudié, Jérôme Mariette, Céline Jeziorki, Sophie Valière, Olivier Bouchez, Christophe Klopp, Rémy Guyoneaud, Marisol Goñi

Supplementary Materials and methods

Sampling procedure and physical and chemical analyses

The sampling sites are located within the Berre lagoon, which is a coastal lagoon of the Mediterranean Sea in Southern France surrounded by industrial (petrochemical) and urban areas. Microbial mats were collected from two different sites (Figure S1): the contaminated site EDB1 that receives effluents from a petrochemical plant, and a less contaminated site SL, located in a bird reserve close to Marignane airport. Samplings were performed in April 2012. After sampling, they were stored in polypropylene tubes for metal analysis and in glass tubes for hydrocarbon analysis kept at 4°C for 8 hours and then frozen at -20°C until analysis. For the isolation and sulfate reduction rate determination, sediments were stored at 4°C in sterile plastics tubes without head-space. For the molecular analysis, sediments were homogenized, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Eleven metals or transition metals (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Sn and Zn) were quantified via Inductively-Coupled-Plasma Mass-Spectrometry (ICPMS) by UT2A (Pau, France). Sediment were freeze-dried and passed through a 2 mm sieve. Total sediment mineralization was realized in a microwave oven using 0.2 g of sediment, 2 ml of concentrated HNO₃ and 2 ml of concentrated HF. The solution was then diluted with MilliQ water. Metal concentration was measured with an internal standard Rh. Water samples were quantified without pre-treatment with an internal standard Rh. Hydrocarbon analyses were performed by the Cedre (Brest, France) using Gas-Chromatography coupled to Mass-Spectrometry (GCMS) as describe by (Stauffert *et al.*, 2013).

Isolation and identification of SRB

High throughput technique was used for SRB isolation following the method described by (Colin *et al.*, 2013) with minor modifications. The culture medium was prepared with filtered water (0.45 µm pore size) from the Berre lagoon and amended with (per liter): Na₂SO₄, 4g; KH₂PO₄, 0.2g; NH₄Cl, 0.24g; selenite-tungstate solution (Widdel & Bak, 1992), 1 mL; trace element SL12 solution (Overmann *et al.*, 1992), 1 mL; vitamins V7 solution (Pfennig & Trüper, 1992), 1 mL; yeast extract, 0.01%; HEPES buffer, 10 mM; Resazurine solution (Widdel & Bak, 1992), 1 mL; lactate-Na, 5 mM; acetate-Na, 5 mM; pyruvate-Na, 5 mM; and glycerol, 5 mM. Medium was sterilized and maintained anoxic by flushing after autoclaving under nitrogen gas flow. Prior to use, FeSO₄.7H₂O, 1 mM and Na₂S₂O₄, 200 µM were added. The pH was adjusted to 7 with NaOH 1M. In order to avoid culture medium oxidation microplates were prepared in an anoxic chamber (Bactron III) with H₂N₂CO₂ and stored in anaerobic bags (BD GasPak™ EZ Anaerobe Gas Generating Pouch System with indicator) at 18°C.

Identification of isolates was performed by 16S rDNA sequencing. Bacterial primers 63F and 1387R (Marchesi *et al.*, 1998) were used to amplify the 16S rDNA gene from the culture as described by (Colin *et al.*, 2013). PCR products were sequenced with Sanger at GATC Biotech (Konstanz, Germany). Sequences were compared with those in Genbank using blast function at the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Phylogenetic trees were constructed using the neighbor joining algorithm on Mega 5.05 software (Tamura *et al.*, 2011) after ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) alignment. Taxonomic richness and rarefaction curves were calculated using Mothur software (Schloss *et al.*, 2009). Sequences having more than 97% identity were classified into the same Operational Taxonomic Unit.

Molecular procedures

After RNA extraction, RNA quality was determined using RNA nano chip on a Bioanalyzer 2100 (Agilent), RIN upper 7 were obtained. Possible DNA contamination of RNA templates was checked by PCR amplification of RNA without reverse transcription step. No DNA was detected. 1 µl of RNA were reverse-transcribed using M-MLV RT and RNase-OUT™ (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using manufacturer's instructions, with random primers (1 µL at 5U/ml) and incubated 2h at 42°C.

Quantification of 16S rDNA and *dsrB* genes and transcripts

16S rDNA and *dsrB* genes and transcripts were quantified using the DyNAmo Flash SYBR Green qPCR kit (Thermo scientific) in a Mx 3005PTM (Stratagene) as described by Paissé *et al.* (2012) using bac1055YF and bac1392R primers (Ritalahti *et al.*, 2006) for 16S rRNA and DSRp2060F and DSR4R primers (Geets *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 1998) for *dsrB*. The standard curve for gene number quantification was performed with the PCR products cloned in the pCR2.1 Topo TA cloning kit (Invitrogen). The standard curve for the transcript quantification was carried out with the RNA obtained after in vitro transcription of the cloned PCR product, using the Megascript® kit (Mobio) and followed by reverse transcription performed as described above. The transcript/gene ratio was determined in order to estimate the gene expression level. Thermal cycling was performed as already described with the annealing temperatures of 50°C and 54°C for 16S rDNA and *dsrB* respectively for 30 s (Paissé *et al.*, 2012). PCR efficiencies varied between 102.3 and 106.8% and the correlation factors (r^2) were not lower than 0.996 in all reactions. The transcript/gene ratio was determined in order to estimate the *dsrB* and 16SrRNA gene expression level. Analysis of variance and Tukey's honest significant differences (HSD) tests were performed using the R MASS package (Ihaka & Gentleman, 1996) in order to compare the genes abundance and the expression level between sites.

Diversity analysis based on 16S rRNA and *dsrB* genes and transcripts

To order to determine the sulfate reducing bacteria compositions, V2 and V3 regions of the 16S rDNA bacterial gene and cDNA were amplified with primers 104F and 530R (Jami & Mizrahi, 2012) containing respectively the adapter CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT and GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT. *dsrB* gene and cDNA were amplified with the same primers that were used for quantitative PCR and containing the same adapter as 16S rDNA primers. Thermal cycling for 16S rDNA was carried as following: 5 min at 94°C, 40 cycles at 94°C for 30 s, 68°C for 30 s and 72°C for 30 s and a final extension for 5 min at 72°C. The PCR conditions for functional gene and transcripts were the same as for qPCR, except for the initial denaturation and final extensions which were made for 5 min at 94 and 72°C respectively.

PCR products were sequenced using MiSeq 250 paired technology (Illumina). Since MiSeq produces paired 250-bp reads, their ends overlap and can be concatenated together in

order to generate high-quality, full-length reads of the entire region in a single run. Single multiplexing was performed using custom 6 bp index sequences, which were added to reverse primers during a second PCR with 12 cycles using forward primer (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC) and reverse primer (CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT). The resulting PCR products were purified and loaded into the Illumina MiSeq cartridge according to the manufacturer instructions. After the run quality check using PhiX each pair-end sequences were assigned to their samples by using the integrated index.

16S rRNA bioinformatic analysis

Raw paired reads were first concatenated with Flash (Magoč & Salzberg, 2011) to retain only those comprising complete amplicon sequence data.

Full length [i.e. concatenated] sequences were processed using the USEARCH algorithm version v7.0.1090_i86linux32 (Edgar, 2013) as follows:

- (1) reads were filtered to a minimal length of 380 and quality 10 using `-fastq_filter` command,
- (2) reads were dereplicated using the `-derep_fulllength` command,
- (3) reads were then aligned to SSU model using SSU-Align (Nawrocki, 2009) and filtered by using coordinates of their alignment,
- (4) reads were merged (pre-clustered) with up to 1% errors using the `-cluster_smallmem` command specifying an identity of 0.99, clusters with less than 2 identical reads were discarded,
- (5) chimeric reads were removed using the `-uchime_ref` command and Gold dataset (Edgar *et al.*, 2011),
- (6) reads were clustered into operational taxonomic units (OTUs) with a maximum distance of 2% using the `-cluster_otu` command
- (7) resulting clusters were merged into consensus sequences by using `-cluster_smallmem` command with `-id 0.97` (3%) and `-centroids` options.

The OTU taxonomy was assigned as the taxonomy associated with the reference sequence from Greengenes tree (DeSantis *et al.*, 2006) which was found as the most similar using `assign_taxonomy.py` script from QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) which wraps Mothur

(Schloss *et al.*, 2009) naive bayes classifier (-m mothur option). Finally, the OTU abundance was computed by aligning of each sample sequences to the final OTU set using USEARCH global alignment routine (i.e. -usearch_global).

Functional genes analysis

We have used the ng6 (Mariette *et al.*, 2012) genefunc pipeline to process data as follows:

- i) Raw data were demultiplexed allowing no ambiguity on index.
- ii) Flash (Magoč & Salzberg, 2011) was then used for paired reads merging, which allowed to reduce the number of error and the number of Ns at the read ends. The analysis was performed with a minimum overlap of 90nt, a maximum overlap length expected in 90% of read pairs of 150nt and 10% as ratio for the maximum mismatch.
- iii) Reads are filtered based on their length (between 350 and 410 nucleotides), the number of ambiguous bases (none allowed) and the presence of PCR chimeras. This analysis was performed using the uchime_denovo algorithm of usearch (Edgar *et al.*, 2011) allowing a minimum of 6 differences in the segment.
- iv) Reads were translated using Framebot (Wang *et al.*, 2013). A database of DsrB proteins was constructed to select the reading frame. Reads with at least a stop codon are discarded.
- v) The resulted amino acid sequences were clustered with CD-HIT (Li & Godzik, 2006) based on a minimum identity of 95%. The replicates consistency was checked by performing a hierarchical clustering and comparing the cluster proportions for each sample. Clusters present in a single sample of a replicate will not be accounted for this replicate. Clusters with a single read were also discarded.
- vi) All filtered clusters were merged by replicates and a random sampling of 1 Million reads was performed.
- vii) The taxonomic affiliation was performed for each cluster centroid using blastp (Camacho *et al.*, 2009) on the DsrB database with the maximum expected value set to $1.10e-5$. The reference database constructed by using nr database from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) contained 250 proteins sequences that include all known genus of sulfate-reducing prokaryote, and exclusively sequences from isolated bacteria. Amino acid sequences were aligned by ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) and distance between species, genus, family and order were calculated on Mega 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

viii) Phylogenetic trees were constructed using the neighbour joining algorithm on Mega 5.05 software (Tamura *et al.*, 2011). For the functional gene species, genus, families and orders level were defined at 95; 90; 75 and 70% of amino acid similarity according to the database distance and according to (Colin *et al.*, 2013).

Meta-genome and Meta-transcriptomic sequencing

RNA-seq libraries were prepared according to Illumina's protocols on a Tecan EVO200 liquid handler using the IlluminaTruSeq Stranded mRNA sample prep kit to analyze RNA after mRNA enrichment using Epicentre RiboZero kit. RNA was fragmented to generate double stranded cDNA. 10 cycles of PCR were applied to amplify libraries. Libraries were quantified by QPCR using the KAPA Library Quantification Kit to obtain a precise quantification. RNA-seq and gDNA sequencing have been performed with the Illumina HiSeq2500 instrument using a paired-end read length of 2x100 pb with the Illumina kits TruSeq SBS sequencing kits v3.

For the adapter removal and read quality control Trim Galore! (Wu *et al.*, 2011) utility, that exploits the trimming tool cutadapt (Martin, 2011) and the quality control tool FastQC (Andrews, 2010), was used. Possible adapter sequences based on the Illumina TruSeq Adapter index were removed from the reads. The reads were then trimmed by quality with a threshold of 30 on the Phred scale and, if either read from a pair was shorter than 50 bp after trimming, that pair was removed from the upstream analyses.

Supplementary Results

Diversity of SRP by molecular and cultural approaches

The diversity of the SRP community and the active SRP community was first assessed through the analysis of bacterial 16S rDNA and *dsrB* genes and transcripts sequences. Shannon diversity index based on the translated *dsrB* genes and transcripts varied between a minimum value of 3.66 on SL night sample and a maximum of 4.81 on EDB1 night sample. For cultural diversity assessment, rarefaction curves of sulfate-reducers (based on 16S rDNA sequencing, 3% cutoff) followed the similar tendency and had not reached the plateau (Figure S2). Shannon and Simpson indexes were respectively 2,087 and 0,189 for EDB1 and 2,105 and 0,162 for SL.

A total of 18 OTU were isolated from EDB1 (Figure S3). Most of the isolates were affiliated with the *Desulfobulbaceae*, within 11 OTUs related to *Desulfotalea*, *Desulfobulbus*, *Desulfopila*, *Desulforhopalus* genera and to the misnamed *Desulfobacterium catecholicum*

(Suzuki *et al.*, 2007). OTU 1 related to *Desulfobacterium catecholicum* NZva20 (99%) represented 35% of the isolates. OTU 2, also a prevalent phylotype with nearly 26% of sequences, was phylogenetically close to the *Desulfopila* strain LSv53 (98% of similarity). OTUs 9, 3 and 20 constituted new taxa based on 97% similarity (Table S1). *Desulfobacteraceae* strains (9%) were affiliated to the genera *Desulfobacula* (OTU 7), *Desulfobacter* (OTU 17) and *Desulfobacterium* (OTU 19) and were exclusively found in EDB1. OTU19 shared less than 97% of identity with their closest relative and constituted new taxa. Only 6 strains (4 OTUs) were related to *Desulfovibrionaceae* affiliated with *Desulfovibrio sp. BerOc1*, *Desulfovibrio aespoeensis*, *Desulfovibrio piezophilus* and *Desulfovibrio portus*.

The 13 SRB OTU isolated from SL (Figure S2) were associated with three families: the *Desulfovibrionaceae*, the *Desulfobulbaceae*, and the *Desulfomicrobiaceae*. The dominant OTU (OTU3) was related to the type strain *Desulfomicrobium baculatum* DSM 4028 (99% sequences similarities). The *Desulfovibrionaceae* were represented by five phylotypes (OTUs 4, 8, 10, 12, and 15). OTU 4 close to the strain *Desulfovibrio dechloroacetivorans* BerOc1 (98% sequences similarities) represented 16.7% of the SL isolates. OTU 12 constituted new taxa whose the closest match (93% of similarity) is *Desulfovibrio capillatus*. Within the *Desulfobulbaceae*, isolates were divided into seven phylotypes (OTUs 1, 2, 6, 13, 14, 23, and 24) with, OTUs 1 being the main phylotype of the *Desulfobulbaceae* (9% of isolates).

References

- Andrews S. (2010). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (Accessed June 25, 2014).
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336.
- Colin Y, Goñi-Urriza M, Caumette P, Guyoneaud R. (2013). Combination of high throughput cultivation and *dsrA* sequencing for assessment of sulfate-reducing bacteria diversity in sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 83:26–37.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72:5069–5072.
- Edgar RC. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 10:996–998.

- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinforma Oxf Engl* 27:2194–2200.
- Geets J, Borremans B, Diels L, Springael D, Vangronsveld J, van der Lelie D, et al. (2006). DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* 66:194–205.
- Ihaka R, Gentleman R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J Comput Graph Stat* 5:299–314.
- Jami E, Mizrahi I. (2012). Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. *PLoS ONE* 7:e33306.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
- Li W, Godzik A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659.
- Magoč T, Salzberg SL. (2011). FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics* btr507.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, et al. (1998). Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64:2333–2333.
- Mariette J, Escudié F, Allias N, Salin G, Noirot C, Thomas S, et al. (2012). NG6: Integrated next generation sequencing storage and processing environment. *BMC Genomics* 13:462.
- Martin M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17:pp. 10–12.
- Nawrocki E. (2009). Structural RNA Homology Search and Alignment Using Covariance Models. *Electron Theses Diss*. <http://openscholarship.wustl.edu/etd/256>.
- Overmann J, Cypionka H, Pfennig N. (1992). An extremely low-light-adapted phototrophic sulfur bacterium from the Black Sea. *Limnol Oceanogr* 37:150–155.
- Paissé S, Goñi-Urriza M, Stadler T, Budzinski H, Duran R. (2012). Ring-hydroxylating dioxygenase (RHD) expression in a microbial community during the early response to oil pollution. *FEMS Microbiol Ecol* 80:77–86.
- Pfennig N, Trüper HG. (1992). The Family Chromatiaceae. In: *The Prokaryotes*, Balows, A, Trüper, HG, Dworkin, M, Harder, W, & Schleifer, K-H (eds), Springer New York, pp. 3200–3221. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-2191-1_8 (Accessed June 25, 2014).
- Ritalahti KM, Amos BK, Sung Y, Wu Q, Koenigsberg SS, Löffler FE. (2006). Quantitative PCR Targeting 16S rRNA and Reductive Dehalogenase Genes Simultaneously Monitors Multiple Dehalococcoides Strains. *Appl Environ Microbiol* 72:2765–2774.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541.
- Stauffert M, Cravo-Laureau C, Jézéquel R, Barantal S, Cuny P, Gilbert F, et al. (2013). Impact of Oil on Bacterial Community Structure in Bioturbated Sediments. *PLoS ONE* 8:e65347.

Suzuki D, Ueki A, Amaishi A, Ueki K. (2007). *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, rod-like, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:520–526.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.

Wagner M, Roger AJ, Flax JL, Brusseau GA, Stahl DA. (1998). Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *J Bacteriol* 180:2975–2982.

Wang Q, Quensen JF, Fish JA, Lee TK, Sun Y, Tiedje JM, et al. (2013). Ecological Patterns of *nifH* Genes in Four Terrestrial Climatic Zones Explored with Targeted Metagenomics Using FrameBot, a New Informatics Tool. *mBio* 4:e00592–13.

Widdel F, Bak F. (1992). Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria. In: *The Prokaryotes*, Balows, A, Trüper, HG, Dworkin, M, Harder, W, & Schleifer, K-H (eds), Springer New York, pp. 3352–3378. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-2191-1_21 (Accessed May 28, 2014).

Wu Z, Wang X, Zhang X. (2011). Using non-uniform read distribution models to improve isoform expression inference in RNA-Seq. *Bioinformatics* 27:502–508.



Figure S1 : The map of Berre lagoon and adjacent areas showing the location of both sampling sites (EDB1 and SL).

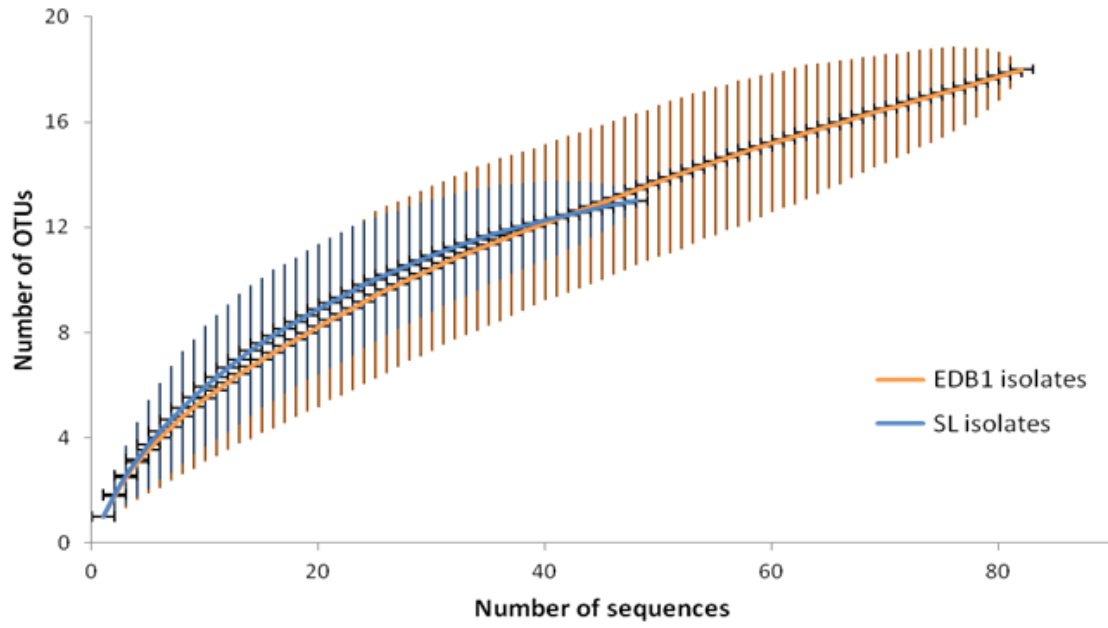


Figure S2: Rarefaction curves of sulfate-reducing isolates diversity based on 3% cutoff for both sites. Vertical bars represent the 95% confidence intervals.

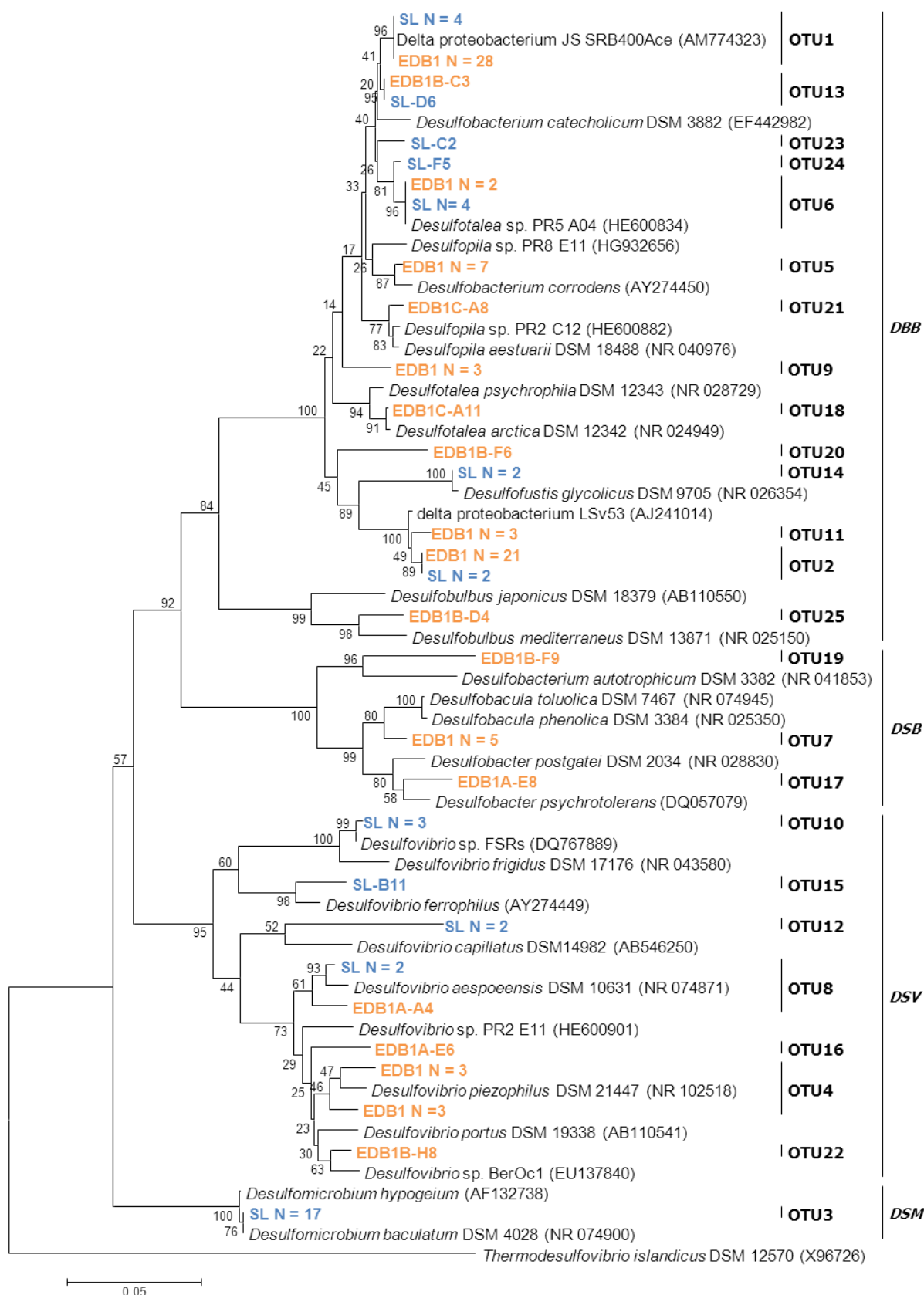


Figure S3 : Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of isolates from EDB1 (orange) and SL (blue) sampling station in the Berre lagoon. The tree was constructed using the neighbour-joining method with bootstrap values based on 1000 replicates.

Table S1 :The new taxa isolated from Berre lagoon based on 97% similarity for species delineation

OTU	Representative strains	Number of isolate	Family	Closest cultured relative	Closest type stains
OTU 20	FM1B-F6	1	<i>DBB</i>	Delta proteobacterium <i>LSv53</i> (AJ241014) 98%	<i>Desulfotalea arctica</i> LSv514 (AF099061) 95%
OTU 9	FM1A-G7	3	<i>DBB</i>	Delta proteobacterium JS_SRB250Lac (AM774321) 96%	<i>Desulfobacterium catecholicum</i> NZva20 (NR_028895) 95%
OTU 19	FM1B-F9	1	<i>DSB</i>	Delta proteobacterium 8aA2 (AB587701) 94%	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> DSM 3382 (AF418177) 94%
OTU 12	FM3-A4	2	<i>DSV</i>	<i>Desulfovibrio capillatus</i> (AB546250) 93%	<i>Desulfovibrio capillatus</i> Met2 (AY176773) 93%

Table S2 : Functional distribution of sulfate-reducers genes and transcripts according to Kegg classification.

Pathway	% of SR reads					
	EDB1			SL		
	DNA	mRNA Day	mRNA Night	DNA	mRNA Day	mRNA Night
I. Cellular Processes						
Cell growth and death	1,29	1,32	1,08	1,32	1,24	1,47
Cell motility	0,98	0,47	0,48	0,70	0,42	0,39
Transport and catabolism	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
II. Environmental Information Processing						
Membrane transport	9,22	7,40	7,98	8,67	5,36	5,40
Signal transduction	3,40	1,55	1,62	2,72	1,22	1,73
Signaling molecules and interaction	0,67	0,85	0,78	0,63	0,91	0,64
Stress	0,58	2,46	2,83	0,57	2,00	3,84
III. Genetic Information Processing						
Folding sorting and degradation	2,51	4,70	3,93	2,47	5,45	5,71
Replication and repair	2,66	0,70	0,80	2,72	0,68	1,18
Transcription	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Translation	5,95	9,85	8,98	6,04	11,50	13,28
IV. Metabolism						
Amino acid metabolism	10,70	6,16	5,44	10,85	7,16	6,19
Biosynthesis of other secondary metabolites	0,22	0,10	0,10	0,25	0,09	0,10
Carbohydrate metabolism						
- Citrate cycle (TCA cycle)	1,90	1,41	1,42	1,94	1,02	1,65
- Glycolysis / Gluconeogenesis	2,04	3,77	3,47	2,12	2,64	2,10
- Other	5,68	4,51	4,45	6,15	4,48	3,97
Energy metabolism						
- Carbon fixation pathways in prokaryotes	2,25	7,78	7,58	2,36	6,18	6,44
- Sulfur metabolism	3,16	17,92	16,99	3,38	19,23	15,45
- Nitrogen metabolism	1,05	1,27	4,59	1,00	5,72	0,95
- Oxidative phosphorylation	2,45	6,20	6,01	2,58	5,00	5,62
- Other	0,41	0,32	0,34	0,40	0,20	0,19
Glycan biosynthesis and metabolism	0,84	0,31	0,33	0,87	0,45	0,32
Lipid metabolism	3,20	2,46	2,24	3,25	1,90	1,96
Metabolism of cofactors and vitamins	3,59	1,58	1,51	3,52	1,66	1,91
Metabolism of terpenoids and polyketides	0,56	0,20	0,23	0,55	0,21	0,29
Nucleotide metabolism	5,68	3,92	4,00	5,88	4,32	5,06
Xenobiotics biodegradation and metabolism						
- Alkane degradation	0,38	0,35	0,31	0,35	0,08	0,11
- Toluene degradation	0,00	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00
- Other	0,53	0,57	0,59	0,49	0,31	0,59
V. Human Diseases						
Drug resistance	0,54	0,16	0,20	0,58	0,13	0,17
Infectious diseases	0,41	0,12	0,12	0,36	0,08	0,13
VI. Other function						
	22,49	9,48	9,59	22,57	8,42	11,00
VII. Unknow function						
	4,68	2,09	2,02	4,74	1,93	2,19

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abed, R. M. M. & Köster, J. (2005).** The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation* **55**, 29–37.
- Abed, R. M. M., Safi, N. M. D., Koster, J., de Beer, D., El-Nahhal, Y., Rullkotter, J. & Garcia-Pichel, F. (2002).** Microbial Diversity of a Heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of Petroleum Compounds. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1674–1683.
- Abed, R. M. M., Zein, B., Al-Thukair, A. & de Beer, D. (2007).** Phylogenetic diversity and activity of aerobic heterotrophic bacteria from a hypersaline oil-polluted microbial mat. *Systematic and Applied Microbiology* **30**, 319–330.
- Achenbach, L. A., Carey, J. & Madigan, M. T. (2001).** Photosynthetic and Phylogenetic Primers for Detection of Anoxygenic Phototrophs in Natural Environments. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2922–2926.
- Allen, M. A., Goh, F., Burns, B. P. & Neilan, B. A. (2009).** Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity of smooth and pustular microbial mat communities in the hypersaline lagoon of Shark Bay. *Geobiology* **7**, 82–96.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143–169.
- Anders, S. & Huber, W. (2010).** Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**, R106.
- Andrews, S. (2010).** FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Ardilly, P. (2006).** *Les techniques de sondage*. Editions TECHNIP.
- Atlas, R. M. (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* **45**, 180–209.
- Aubé, J., Senin, P., Escudié, F., Mariette, J., Jeziorski, C., Valière, S., Bouchez, O., Klopp, C., Guyoneaud, R. & Goni-Urriza, M. (submitted).** Structure and functioning of sulfate-reducing communities in two contrastively hydrocarbon contaminated microbial mats characterized by polyphasic approaches. *The ISME Journal*.
- Aubé, J., Senin, P., Bonin, P., Pringault, O., Deflandre, B., Klopp, C., Guyoneaud, R. & Goni-Urriza, M. S. (in prep).** Diversity, activity and functioning of two microbial mats contrasted by their hydrocarbon contamination.

B

- Baker, B. J., Comolli, L. R., Dick, G. J., Hauser, L. J., Hyatt, D., Dill, B. D., Land, M. L., VerBerkmoes, N. C., Hettich, R. L. & Banfield, J. F. (2010).** Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *PNAS* **107**, 8806–8811.

- Barth, H. J. (2003).** The influence of cyanobacteria on oil polluted intertidal soils at the Saudi Arabian Gulf shores. *Mar Pollut Bull* **46**, 1245–1252.
- Barton, L. L. & Tomei, F. A. (1995).** Characteristics and Activities of Sulfate-Reducing Bacteria. In *Sulfate-Reducing Bacteria*, Biotechnology Handbooks, pp. 1–32. Edited by L. L. Barton. Springer US.
- Beau Monvoisin, N. & LyonDellBasell. (2009).** *Déversement accidentel d'hydrocarbures, sur l'étang de Berre suite à un débordement des bassins d'orage de la Compagnie Pétrochimique de Berre (CPB)*.
- Van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M. & Witholt, B. (2003).** Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. *Oil & Gas Science and Technology* **58**, 427–440.
- Béjà, O., Suzuki, M. T., Heidelberg, J. F., Nelson, W. C., Preston, C. M., Hamada, T., Eisen, J. A., Fraser, C. M. & DeLong, E. F. (2002).** Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* **415**, 630–633.
- Bender, J., Duff, M. C., Phillips, P. & Hill, M. (2000).** Bioremediation and Bioreduction of Dissolved U(VI) by Microbial Mat Consortium Supported on Silica Gel Particles. *Environmental Science & Technology* **34**, 3235–3241.
- Bender, J. & Phillips, P. (2004).** Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresour Technol* **94**, 229–238.
- Benthien, M., Wieland, A., de Oteyza, T. G., Grimalt, J. O. & Köhl, M. (2004).** Oil-contamination effects on a hypersaline microbial mat community (Camargue, France) as studied with microsensors and geochemical analysis. *Ophelia* **58**, 135–150.
- Berthe-Corti, L. & Höpner, T. (2005).** Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, Geobiology: Objectives, Concept, Perspectives* **219**, 171–189.
- Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R. & Normand, P. (2011).** *Ecologie microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Publications de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour.
- Blaabjerg, V., Mouritsen, K. N. & Finster, K. (1998).** Diel cycles of sulphate reduction rates in sediments of a *Zostera marina* bed (Denmark). *Aquatic Microbial Ecology* **15**, 97–102.
- Bolhuis, H. & Stal, L. J. (2011).** Analysis of bacterial and archaeal diversity in coastal microbial mats using massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *ISME J* **5**, 1701–1712.
- Bolhuis, H., Fillinger, L. & Stal, L. J. (2013).** Coastal Microbial Mat Diversity along a Natural Salinity Gradient. *PLoS ONE* **8**, e63166.
- Bonin, P. C. & Michotey, V. D. (2006).** Nitrogen budget in a microbial mat in the Camargue (southern France). *Mar Ecol Prog Ser* **322**, 75–84.
- Bordenave, S. (2007).** *Impact d'une contamination pétrolière sur les tapis microbiens et étude de leur réponse*. Pau.
- Bordenave, S., Jézéquel, R., Fourçans, A., Budzinski, H., Merlin, F. X., Fourel, T., Goñi-Urriza, M., Guyoneaud, R., Grimaud, R. & other authors. (2004).** Degradation of the 'Erika' oil. *Aquatic Living Resources* **17**, 261–267.

- Bordenave, S., Goni-Urriza, M. S., Caumette, P. & Duran, R. (2007).** Effects of Heavy Fuel Oil on the Bacterial Community Structure of a Pristine Microbial Mat. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6089–6097.
- Bordenave, S., Goñi-urriza, M., Vilette, C., Blanchard, S., Caumette, P. & Duran, R. (2008).** Diversity of ring-hydroxylating dioxygenases in pristine and oil contaminated microbial mats at genomic and transcriptomic levels. *Environmental Microbiology* **10**, 3201–3211.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. & Forterre, P. (2008).** Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Micro* **6**, 245–252.
- Brown, M. V., Schwalbach, M. S., Hewson, I. & Fuhrman, J. A. (2005).** Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environ Microbiol* **7**, 1466–1479.
- Burow, L. C., Woebken, D., Marshall, I. P. G., Lindquist, E. A., Bebout, B. M., Prufert-Bebout, L., Hoehler, T. M., Tringe, S. G., Pett-Ridge, J. & other authors. (2013).** Anoxic carbon flux in photosynthetic microbial mats as revealed by metatranscriptomics. *ISME J* **7**, 817–829.

C

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. & Madden, T. L. (2009).** BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 421.
- Campbell, B. J. & Cary, S. C. (2004).** Abundance of reverse tricarboxylic acid cycle genes in free-living microorganisms at deep-sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6282–6289.
- Canfield, D. E. & Des Marais, D. J. (1993).** Biogeochemical cycles of carbon, sulfur, and free oxygen in a microbial mat. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**, 3971–3984.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K. & other authors. (2010).** QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**, 335–336.
- Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V. J., Gasol, J. M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F. & Pedrós-Alió, C. (2002).** Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology* **4**, 338–348.
- Cerniglia, C. E., Baalen, C. V. & Gibson, D. T. (1980a).** Metabolism of Naphthalene by the Cyanobacterium *Oscillatoria* sp., Strain JCM. *J Gen Microbiol* **116**, 485–494.
- Cerniglia, C., Gibson, D. & Vanbaalen, C. (1980b).** Oxidation of Naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae. *J Gen Microbiol* **116**, 495–500.
- Chaillan, F., Gugger, M., Saliot, A., Couté, A. & Oudot, J. (2006).** Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. *Chemosphere* **62**, 1574–1582.

- Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y.-H., Grimont, P., Saliot, A. & Oudot, J. (2004).** Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol* **155**, 587–595.
- Chen, H. & Boutros, P. C. (2011).** VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* **12**, 35.
- Cline, J. D. (1969).** Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* **14**, 454–458.
- Coelho, M. R. R., Marriel, I. E., Jenkins, S. N., Lanyon, C. V., Seldin, L. & O'Donnell, A. G. (2009).** Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology* **42**, 48–53.
- Cohen, Y., Jørgensen, B. B., Padan, E. & Shilo, M. (1975).** Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature* **257**, 489–492.
- Colin, Y., Goñi-Urriza, M., Caumette, P. & Guyoneaud, R. (2013).** Combination of high throughput cultivation and dsrA sequencing for assessment of sulfate-reducing bacteria diversity in sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **83**, 26–37.
- Coman, C., Drugă, B., Hegedus, A., Sicora, C. & Dragoș, N. (2013).** Archaeal and bacterial diversity in two hot spring microbial mats from a geothermal region in Romania. *Extremophiles* **17**, 523–534.
- Coolen, M. J. L., Abbas, B., van Bleijswijk, J., Hopmans, E. C., Kuypers, M. M. M., Wakeham, S. G. & Sinninghe Damsté, J. S. (2007).** Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environ Microbiol* **9**, 1001–1016.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711–745.
- Coulter, E. D. & Kurtz, D. M. (2001).** A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. *Arch Biochem Biophys* **394**, 76–86.
- Coyne, M. S., Arunakumari, A., Averill, B. A. & Tiedje, J. M. (1989).** Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2924–2931.
- Cypionka, H., Widdel, F. & Pfennig, N. (1985).** Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiology Letters* **31**, 39–45.

D

- Dade, W. B., Davis, J. D., Nichols, P. D., Nowell, A. R. M., Thistle, D., Trexler, M. B. & White, D. C. (1990).** Effects of bacterial exopolymer adhesion on the entrainment of sand. *Geomicrobiology Journal* **8**, 1–16.
- Dannenbergh, S., Kroder, M., Dilling, W. & Cypionka, H. (1992).** Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* **158**, 93–99.

- Decho, A. W. (1990).** Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* **28**, 73–153.
- 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.
- Dilling, W. & Cypionka, H. (1990).** Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **71**, 123–127.
- Dillon, J. G., Miller, S., Bebout, B., Hullar, M., Pinel, N. & Stahl, D. A. (2009).** Spatial and temporal variability in a stratified hypersaline microbial mat community. *FEMS Microbiology Ecology* **68**, 46–58.
- Dolla, A., Fournier, M. & Dermoun, Z. (2006).** Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology, Aspects of Prokaryotic Genome Research 2nd European Conference on Prokaryotic Genomes* **126**, 87–100.
- Dorff, K. C., Chambwe, N., Zeno, Z., Simi, M., Shaknovich, R. & Campagne, F. (2013).** GobyWeb: Simplified Management and Analysis of Gene Expression and DNA Methylation Sequencing Data. *PLoS ONE* **8**, e69666.
- Du, H., Jiao, N., Hu, Y. & Zeng, Y. (2006).** Real-time PCR for quantification of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria based on *pufM* gene in marine environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **329**, 113–121.
- Duran, R. & Goñi-Urriza, M. S. (2010).** Impact of Pollution on Microbial Mats. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pp. 2339–2348. Edited by K. N. Timmis. Springer Berlin Heidelberg.
- Dyksterhouse, S. E., Gray, J. P., Herwig, R. P., Lara, J. C. & Staley, J. T. (1995).** *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 116–123.

E

- Edgar, R. C. (2013).** UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* **10**, 996–998.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. (2011).** UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200.
- Eggleton, J. & Thomas, K. V. (2004).** A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environ Int* **30**, 973–980.
- Elsaied, H. & Naganuma, T. (2001).** Phylogenetic Diversity of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large-Subunit Genes from Deep-Sea Microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1751–1765.
- Etcheber, H., Relexans, J.-C., Beliard, M., Weber, O., Buscail, R. & Heussner, S. (1999).** Distribution and quality of sedimentary organic matter on the Aquitanian margin (Bay of Biscay). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **46**, 2249–2288.

F

- Fan, L.-F., Tang, S.-L., Chen, C.-P. & Hsieh, H.-L. (2012). Diversity and Composition of Sulfate- and Sulfite-Reducing Prokaryotes as Affected by Marine-Freshwater Gradient and Sulfate Availability. *Microb Ecol* **63**, 224–237.
- Ferrera, I., Borrego, C. M., Salazar, G. & Gasol, J. M. (2013). Marked seasonality of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the coastal NW Mediterranean Sea as revealed by cell abundance, pigment concentration and pyrosequencing of pufM gene. *Environ Microbiol* n/a–n/a.
- Fossing, H. & Jørgensen, B. B. (1989). Measurement of bacterial sulfate reduction in sediments: Evaluation of a single-step chromium reduction method. *Biogeochemistry* **8**, 205–222.
- Fourçans, A., Ranchou-Peyruse, A., Caumette, P. & Duran, R. (2008). Molecular analysis of the spatio-temporal distribution of sulfate-reducing bacteria (SRB) in Camargue (France) hypersaline microbial mat. *Microb Ecol* **56**, 90–100.
- Franks, J. & Stolz, J. F. (2009). Flat laminated microbial mat communities. *Earth-Science Reviews* **96**, 163–172.
- Friedrich, C. G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A. & Fischer, J. (2005). Prokaryotic sulfur oxidation. *Current Opinion in Microbiology*, Ecology and industrial microbiology/Edited by Sergio Sánchez and Betty Olson · Techniques/Edited by Peter J Peters and Joel Swanson **8**, 253–259.
- Frigaard, N.-U. & Dahl, C. (2008). Sulfur Metabolism in Phototrophic Sulfur Bacteria. In *Advances in Microbial Physiology*, pp. 103–200. Edited by Robert K. Poole. Academic Press.
- Frith, M. C., Hamada, M. & Horton, P. (2010). Parameters for accurate genome alignment. *BMC Bioinformatics* **11**, 80.

G

- Gallardo, V. A. & Espinoza, C. (2007). New communities of large filamentous sulfur bacteria in the eastern South Pacific. *Int Microbiol* **10**, 97–102.
- Garcia de Oteyza, T. & Grimalt, J. O. (2006). GC and GC–MS characterization of crude oil transformation in sediments and microbial mat samples after the 1991 oil spill in the Saudi Arabian Gulf coast. *Environmental Pollution* **139**, 523–531.
- Garcia-Pichel, F., Mechling, M. & Castenholz, R. W. (1994). Diel Migrations of Microorganisms within a Benthic, Hypersaline Mat Community. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1500–1511.
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. & Vanbroekhoven, K. (2006). DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **66**, 194–205.
- Van Gernerden, H. (1993). Microbial mats: a joint venture. *Marine Geology* **113**, 3–25.
- Ghosh, W. & Dam, B. (2009). Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews* **33**, 999–1043.

- Gihring, T. M., Green, S. J. & Schadt, C. W. (2012).** Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environ Microbiol* **14**, 285–290.
- Giloteaux, L., Goñi-Urriza, M. & Duran, R. (2010).** Nested PCR and new primers for analysis of sulfate-reducing bacteria in low-cell-biomass environments. *Appl Environ Microbiol* **76**, 2856–2865.
- González, J. M., Simó, R., Massana, R., Covert, J. S., Casamayor, E. O., Pedrós-Alió, C. & Moran, M. A. (2000).** Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4237–4246.
- Goregues, C., MICHOTEY, V. & BONIN, P. (2004).** Isolation of hydrocarbonoclastic denitrifying bacteria from berre microbial mats. *OPHELIA* **58**, 263–270.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G. & Bailey, M. J. (2000).** Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5488–5491.
- Grossi, V., Cravo-Laureau, C., Guyoneaud, R., Ranchou-Peyruse, A. & Hirschler-Réa, A. (2008).** Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: A summary. *Organic Geochemistry*, Advances in Organic Geochemistry 2007 Proceedings of the 23rd International Meeting on Organic Geochemistry **39**, 1197–1203.
- Grötzschel, S., Köster, J., Abed, R. M. M. & Beer, D. de. (2002).** Degradation of petroleum model compounds immobilized on clay by a hypersaline microbial mat. *Biodegradation* **13**, 273–283.
- Guyoneaud, R., Matheron, R., Baulaigue, R., Podeur, K., Hirschler, A. & Caumette, P. (1996).** Anoxygenic phototrophic bacteria in eutrophic coastal lagoons of the French Mediterranean and Atlantic Coasts (Prévost Lagoon, Arcachon Bay, Certes fishponds). In *Coastal Lagoon Eutrophication and ANaerobic Processes (CLEAN)*, Developments in Hydrobiology, pp. 33–43. Edited by P. Caumette, J. Castel & R. Herbert. Springer Netherlands.

H

- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K. & other authors. (2011).** Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* **21**, 494–504.
- Hamme, J. D. V., Singh, A. & Ward, O. P. (2003).** Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 503–549.
- Hanson, T. E. & Tabita, F. R. (2001).** A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. *PNAS* **98**, 4397–4402.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. & Shutsubo, K. (1999).** Petroleum biodegradation in marine environments. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 63–70.
- Al-Hasan, R. H., Al-Bader, D. A., Sorkhoh, N. A. & Radwan, S. S. (1998).** Evidence for n-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. *Marine Biology* **130**, 521–527.

- Head, I. M., Jones, D. M. & Röling, W. F. M. (2006).** Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Micro* **4**, 173–182.
- Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R. & Widdel, F. (1998).** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 459–473.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S. & Philippot, L. (2006).** Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5181–5189.
- Hernandez-Raquet, G., Budzinski, H., Caumette, P., Dabert, P., Le Ménach, K., Muyzer, G. & Duran, R. (2006).** Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the Etang de Berre (France). *FEMS Microbiol Ecol* **58**, 550–562.
- Hipp, W. M., Pott, A. S., Thum-Schmitz, N., Faath, I., Dahl, C. & Trüper, H. G. (1997).** Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology (Reading, Engl)* **143** (Pt 9), 2891–2902.
- Hoehler, T. M., Bebout, B. M. & Des Marais, D. J. (2001).** The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature* **412**, 324–327.
- Hong, S., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S. & Epstein, S. S. (2009).** Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME J* **3**, 1365–1373.
- Hopkinson, B. M., Dupont, C. L., Allen, A. E. & Morel, F. M. M. (2011).** Efficiency of the CO₂-concentrating mechanism of diatoms. *PNAS* **108**, 3830–3837.
- Hornafius, J. S., Quigley, D. & Luyendyk, B. P. (1999).** The world's most spectacular marine hydrocarbon seeps (Coal Oil Point, Santa Barbara Channel, California): Quantification of emissions. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **104**, 20703–20711.
- Hubas, C., Jesus, B., Passarelli, C. & Jeanthon, C. (2011).** Tools providing new insight into coastal anoxygenic purple bacterial mats: review and perspectives. *Research in Microbiology* **162**, 858–868.
- Hügler, M., Gärtner, A. & Imhoff, J. F. (2010).** Functional genes as markers for sulfur cycling and CO₂ fixation in microbial communities of hydrothermal vents of the Logatchev field. *FEMS Microbiol Ecol* **73**, 526–537.
- Hurt, R. A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M. & Zhou, J. (2001).** Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4495–4503.

I

- Ihaka, R. & Gentleman, R. (1996).** R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299–314.
- Imhoff, J. F. (2008).** Systematics of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. In *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*, Advances in Photosynthesis and Respiration, pp. 269–287. Edited by R. Hell, D. C. Dahl, D. Knaff & T. Leustek. Springer Netherlands.

J

- Jami, E. & Mizrahi, I. (2012).** Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. *PLoS ONE* **7**, e33306.
- Jørgensen, B. B. (1982).** Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulphate reduction. *Nature* **296**, 643–645.
- Jørgensen, B. B. & Des Marais, D. J. (1986).** Competition for sulfide among colorless and purple sulfur bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol Ecol* **38**, 179–186.
- Jose, J., Giridhar, R., Anas, A., Loka Bharathi, P. A. & Nair, S. (2011).** Heavy metal pollution exerts reduction/adaptation in the diversity and enzyme expression profile of heterotrophic bacteria in Cochin estuary, India. *Environmental Pollution* **159**, 2775–2780.

K

- Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R. R., Smith, D. C. & D'Hondt, S. (2012).** Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *PNAS* **109**, 16213–16216.
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschirko, D., Bru, D. & Philippot, L. (2006).** Abundance of narG, nirS, nirK, and nosZ genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5957–5962.
- Kanehisa, M. & Goto, S. (2000).** KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **28**, 27–30.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. & Tanabe, M. (2014).** Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* **42**, D199–205.
- Khelifi, N., Amin Ali, O., Roche, P., Grossi, V., Brochier-Armanet, C., Valette, O., Ollivier, B., Dolla, A. & Hirschler-Réa, A. (2014).** Anaerobic oxidation of long-chain n-alkanes by the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon, *Archaeoglobus fulgidus*. *ISME J*.
- Kielbasa, S. M., Wan, R., Sato, K., Horton, P. & Frith, M. C. (2011).** Adaptive seeds tame genomic sequence comparison. *Genome Res* **21**, 487–493.
- Kirchman, D. L. (2012).** *Processes in Microbial Ecology*. Oxford University Press.
- Kleindienst, S., Herbst, F.-A., Stagars, M., von Netzer, F., von Bergen, M., Seifert, J., Peplies, J., Amann, R., Musat, F. & other authors. (2014).** Diverse sulfate-reducing bacteria of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* clade are the key alkane degraders at marine seeps. *ISME J*.
- Klein, M., Friedrich, M., Roger, A. J., Hugenholtz, P., Fishbain, S., Abicht, H., Blackall, L. L., Stahl, D. A. & Wagner, M. (2001).** Multiple Lateral Transfers of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes between Major Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *J Bacteriol* **183**, 6028–6035.
- Koh, E. Y., Phua, W. & Ryan, K. G. (2011).** Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Antarctic sea ice and seawater. *Environ Microbiol Rep* **3**, 710–716.

- Kolmert, A., Wikström, P. & Hallberg, K. B. (2000).** A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *J Microbiol Methods* **41**, 179–184.
- Kong, W., Ream, D. C., Priscu, J. C. & Morgan-Kiss, R. M. (2012).** Diversity and Expression of RubisCO Genes in a Perennially Ice-Covered Antarctic Lake during the Polar Night Transition. *Appl Environ Microbiol* **78**, 4358–4366.
- Kosolapov, D. b., Kusch, P., Vainshtein, M. b., Vatsourina, A. v., Wießner, A., Kästner, M. & Müller, R. a. (2004).** Microbial Processes of Heavy Metal Removal from Carbon-Deficient Effluents in Constructed Wetlands. *Engineering in Life Sciences* **4**, 403–411.
- Kowalchuk, G. A. & Stephen, J. R. (2001).** AMMONIA-OXIDIZING BACTERIA: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology* **55**, 485–529.
- Krekeler, D., Teske, A. & Cypionka, H. (1998).** Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiology Ecology* **25**, 89–96.
- Kuhn, E. P., Colberg, P. J., Schnoor, J. L., Wanner, O., Zehnder, A. J. P. & Schwarzenbach, R. P. (1985).** Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: laboratory column studies. *Environ Sci Technol* **19**, 961–968.
- Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H. & Hugenholtz, P. (2010).** Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* **12**, 118–123.

L

- Laanbroek, H. J. & Pfennig, N. (1981).** Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in freshwater and in marine sediments. *Arch Microbiol* **128**, 330–335.
- Laanbroek, H. J., Geerligs, H. J., Sijtsma, L. & Veldkamp, H. (1984).** Competition for sulfate and ethanol among desulfobacter, desulfobulbus, and desulfovibrio species isolated from intertidal sediments. *Appl Environ Microbiol* **47**, 329–334.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A. & other authors. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948.
- Lazar, C. S., Dinasquet, J., L'Haridon, S., Pignet, P. & Toffin, L. (2011).** Distribution of anaerobic methane-oxidizing and sulfate-reducing communities in the G11 Nyegga pockmark, Norwegian Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek* **100**, 639–653.
- Leahy, J. G. & Colwell, R. R. (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* **54**, 305–315.
- Lejeune, M. (2006).** La théorie des sondages. *Images des Mathématiques*.
- Leloup, J., Quillet, L., Berthe, T. & Petit, F. (2006).** Diversity of the dsrAB (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *FEMS Microbiology Ecology* **55**, 230–238.

- Lenk, S., Arnds, J., Zerjatke, K., Musat, N., Amann, R. & Mußmann, M. (2011).** Novel groups of Gammaproteobacteria catalyse sulfur oxidation and carbon fixation in a coastal, intertidal sediment. *Environmental Microbiology* **13**, 758–774.
- Lê, S., Rennes, A., Josse, J., Rennes, A., Husson, F. & Rennes, A. (2008).** FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* 1–18.
- Ley, R. E., Harris, J. K., Wilcox, J., Spear, J. R., Miller, S. R., Bebout, B. M., Maresca, J. A., Bryant, D. A., Sogin, M. L. & Pace, N. R. (2006).** Unexpected Diversity and Complexity of the Guerrero Negro Hypersaline Microbial Mat. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3685–3695.
- Lipiatou, E., Tolosa, I., Simó, R., Bouloubassi, I., Dachs, J., Marti, S., Sicre, M.-A., Bayona, J. M., Grimalt, J. O. & other authors. (1997).** Mass budget and dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **44**, 881–905.
- Li, W. & Godzik, A. (2006).** Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **22**, 1658–1659.
- Llirós, M., Gaju, N., de Oteyza, T. G., Grimalt, J. O., Esteve, I. & Martínez-Alonso, M. (2008).** Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. II. The changes in microbial species. *Sci Total Environ* **393**, 39–49.
- Lloyd, K. G., Albert, D. B., Biddle, J. F., Chanton, J. P., Pizarro, O. & Teske, A. (2010).** Spatial Structure and Activity of Sedimentary Microbial Communities Underlying a *Beggiatoa* spp. Mat in a Gulf of Mexico Hydrocarbon Seep. *PLoS ONE* **5**, e8738.
- Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D. & Nivière, V. (2000).** Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. *J Biol Chem* **275**, 115–121.
- López-Gutiérrez, J. C., Henry, S., Hallet, S., Martin-Laurent, F., Catroux, G. & Philippot, L. (2004).** Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *J Microbiol Methods* **57**, 399–407.
- Lovley, D. & Phillips, E. (1994).** Novel Processes for Anaerobic Sulfate Production from Elemental Sulfur. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2394–2399.
- Lozupone, C. A. & Knight, R. (2007).** Global patterns in bacterial diversity. *PNAS* **104**, 11436–11440.
- Luther, G. W., Findlay, A. J., MacDonald, D. J., Owings, S. M., Hanson, T. E., Beinart, R. A. & Girguis, P. R. (2011).** Thermodynamics and Kinetics of Sulfide Oxidation by Oxygen: A Look at Inorganically Controlled Reactions and Biologically Mediated Processes in the Environment. *Front Microbiol* **2**.
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J. & Riley, P. W. (2002).** The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology (Reading, Engl)* **148**, 3521–3530.

M

- Magoč, T. & Salzberg, S. L. (2011).** FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics* btr507.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., Dymock, D. & Wade, W. G. (1998).** Design and Evaluation of Useful Bacterium-

- Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2333–2333.
- Mardis, E. R. (2008).** Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**, 387–402.
- Margulis, L., Barghoorn, E. S., Ashendorf, D., Banerjee, S., Chase, D., Francis, S., Giovannoni, S. & Stolz, J. (1980).** The microbial community in the layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico: Does it have Precambrian analogues? *Precambrian Research* **11**, 93–123.
- Mariette, J., Escudié, F., Allias, N., Salin, G., Noirot, C., Thomas, S. & Klopp, C. (2012).** NG6: Integrated next generation sequencing storage and processing environment. *BMC Genomics* **13**, 462.
- Markowitz, V. M., Chen, I.-M. A., Chu, K., Szeto, E., Palaniappan, K., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Pati, A. & other authors. (2011).** IMG/M: the integrated metagenome data management and comparative analysis system. *Nucleic Acids Research* **40**, D123–D129.
- Marshall, K. C. (1989).** Cyanobacterial-heterotrophic bacterial interaction.
- Martínez, A., Pibernat, I., Figueras, J. & García-Gil, J. (1997).** Structure and composition of freshwater microbial mats from a sulfur spring ('Font Pudosa', NE Spain). *Microbiologia* **13**, 45–56.
- Martin, M. (2011).** Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, pp. 10–12.
- Mason, O. U., Hazen, T. C., Borglin, S., Chain, P. S. G., Dubinsky, E. A., Fortney, J. L., Han, J., Holman, H.-Y. N., Hultman, J. & other authors. (2012).** Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J* **6**, 1715–1727.
- Megharaj, M., Singleton, I., McClure, N. C. & Naidu, R. (2000).** Influence of Petroleum Hydrocarbon Contamination on Microalgae and Microbial Activities in a Long-Term Contaminated Soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **38**, 439–445.
- Mehrabi, S., Ekanemesang, U. M., Aikhionbare, F. O., Kimbro, K. S. & Bender, J. (2001).** Identification and characterization of *Rhodopseudomonas* spp., a purple, non-sulfur bacterium from microbial mats. *Biomol Eng* **18**, 49–56.
- Mettel, C., Kim, Y., Shrestha, P. M. & Liesack, W. (2010).** Extraction of mRNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 5995–6000.
- Meyer, B. & Kuever, J. (2007).** Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes--origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology (Reading, Engl)* **153**, 2026–2044.
- Meyer, B., Imhoff, J. F. & Kuever, J. (2007).** Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the soxB gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environ Microbiol* **9**, 2957–2977.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R. & other authors. (2008).** The metagenomics RAST

- server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* **9**, 386.
- Miller, S. R. & Bebout, B. M. (2004).** Variation in Sulfide Tolerance of Photosystem II in Phylogenetically Diverse Cyanobacteria from Sulfidic Habitats. *Appl Environ Microbiol* **70**, 736–744.
- Mills, H. J., Martinez, R. J., Story, S. & Sobecky, P. A. (2004).** Identification of Members of the Metabolically Active Microbial Populations Associated with Beggiatoa Species Mat Communities from Gulf of Mexico Cold-Seep Sediments. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5447–5458.
- Minjeaud, L., Bonin, P. C. & Michotey, V. D. (2008).** Nitrogen fluxes from marine sediments: quantification of the associated co-occurring bacterial processes. *Biogeochemistry* **90**, 141–157.
- Moran, M. A., Satinsky, B., Gifford, S. M., Luo, H., Rivers, A., Chan, L.-K., Meng, J., Durham, B. P., Shen, C. & other authors. (2013).** Sizing up metatranscriptomics. *ISME J* **7**, 237–243.
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. C. & Kanehisa, M. (2007).** KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* **35**, W182–185.
- Morse, R., Gibson, G. R. & Collins, M. D. (2000).** Secondary structure analysis of the dissimilatory sulphite reductase in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Lett Appl Microbiol* **30**, 375–378.
- Mulder, A., van de Graaf, A. A., Robertson, L. A. & Kuenen, J. G. (1995).** Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* **16**, 177–183.
- Mußmann, M., Ishii, K., Rabus, R. & Amann, R. (2005).** Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environmental Microbiology* **7**, 405–418.
- Muyzer, G. & Stams, A. J. M. (2008).** The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**, 441–454.

N

- Nakai, R., Abe, T., Baba, T., Imura, S., Kagoshima, H., Kanda, H., Kohara, Y., Koi, A., Niki, H. & other authors. (2012).** Diversity of RuBisCO gene responsible for CO₂ fixation in an Antarctic moss pillar. *Polar Biol* **35**, 1641–1650.
- National Research Council. (2002).** *Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects*, Washington DC: National Academy of Sciences.
- Nawrocki, E. (2009).** Structural RNA Homology Search and Alignment Using Covariance Models. *Electronic theses and dissertations*.
- Nielsen, L. P. (1992).** Denitrification in sediment determined from nitrogen isotope pairing. *FEMS Microbiology Ecology* **9**, 357–361.
- Nies, D. H. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 730–750.

Normand, P. & Bousquet, J. (1989). Phylogeny of nitrogenase sequences in Frankia and other nitrogen-fixing microorganisms. *J Mol Evol* **29**, 436–447.

O

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M. & Wagner, H. (2013). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-8.

Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. L. & Mah, R. A. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev* **58**, 27–38.

Ollivier, B. & Magot, M. (2005). *Petroleum microbiology*. Washington, D.C.: ASM Press.

O'Rourke, D. & Connolly, S. (2003). Just oil? The distribution of environmental and social impacts of oil production and consumption **28**.

O'Sullivan, L. A., Sass, A. M., Webster, G., Fry, J. C., Parkes, R. J. & Weightman, A. J. (2013). Contrasting relationships between biogeochemistry and prokaryotic diversity depth profiles along an estuarine sediment gradient. *FEMS Microbiol Ecol* **85**, 143–157.

De Oteyza, T. G., Grimalt, J. O., Llirós, M. & Esteve, I. (2006). Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. *Sci Total Environ* **357**, 12–24.

Overmann, J., Cypionka, H. & Pfennig, N. (1992). An extremely low-light-adapted phototrophic sulfur bacterium from the Black Sea. *Limnology & Oceanography* **37**, 150–155.

P

Paerl & Pinckney. (1996). A Mini-review of Microbial Consortia: Their Roles in Aquatic Production and Biogeochemical Cycling. *Microb Ecol* **31**, 225–247.

Paerl, H. W., Pinckney, J. L. & Steppe, T. F. (2000). Cyanobacterial–bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environmental Microbiology* **2**, 11–26.

Paissé, S. (2009). *Etude de la réponse d'une communauté bactérienne de sédiments côtiers à une contamination pétrolière*.

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 Ecol* **66**, 295–305.

Paissé, S., Goni-Urriza, M., Coulon, F. & Duran, R. (2010). How a Bacterial Community Originating from a Contaminated Coastal Sediment Responds to an Oil Input. *Microb Ecol* **60**, 394–405.

Paissé, S., Goñi-Urriza, M., Stadler, T., Budzinski, H. & Duran, R. (2012). Ring-hydroxylating dioxygenase (RHD) expression in a microbial community during the early response to oil pollution. *FEMS Microbiol Ecol* **80**, 77–86.

Pastor, L., Deflandre, B., Viollier, E., Cathalot, C., Metzger, E., Rabouille, C., Escoubeyrou, K., Lloret, E., Pruski, A. M. & other authors. (2011). Influence of the organic matter composition on benthic oxygen demand in the Rhône River prodelta (NW Mediterranean Sea). *Continental Shelf Research* **31**, 1008–1019.

- Paul, K., Nonoh, J. O., Mikulski, L. & Brune, A. (2012).** ‘Methanoplasmatales,’ Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* **78**, 8245–8253.
- Pérez-Jiménez, J. R., Young, L. Y. & Kerkhof, L. J. (2001).** Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfite reductase (dsrAB) genes. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 145–150.
- Petri, R., Podgorsek, L. & Imhoff, J. F. (2001).** Phylogeny and distribution of the soxB gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **197**, 171–178.
- Pfennig, N. (1967).** Photosynthetic Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **21**, 285–324.
- Pfennig, N. & Trüper, H. G. (1992).** The Family Chromatiaceae. In *The Prokaryotes*, pp. 3200–3221. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. Springer New York.
- Pham, V. H., Yong, J.-J., Park, S.-J., Yoon, D.-N., Chung, W.-H. & Rhee, S.-K. (2008).** Molecular analysis of the diversity of the sulfide : quinone reductase (sqr) gene in sediment environments. *Microbiology (Reading, Engl)* **154**, 3112–3121.
- Poly, F., Monrozier, L. J. & Bally, R. (2001).** Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol* **152**, 95–103.
- Poly, F., Wertz, S., Brothier, E. & Degrange, V. (2008).** First exploration of Nitrobacter diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene nxrA. *FEMS Microbiol Ecol* **63**, 132–140.
- Prince, R. C., Lessard, R. R. & Clark, J. R. (2003).** Bioremediation of Marine Oil Spills. *Oil & Gas Science and Technology* **58**, 463–468.
- Pringault, O. & Garcia-Pichel, F. (2004).** Hydrotaxis of cyanobacteria in desert crusts. *Microb Ecol* **47**, 366–373.
- Pringault, O., Aubé, J., Bouchez, O., Klopp, C., Mariette, J., Escudié, F., Senin, P. & Goni-Urriza, M. (submitted).** Contrasted effects of natural complex mixtures of PAHs and metals on oxygen cycle in a microbial mat. *Chemosphere*.
- Purdy, K. J., Nedwell, D. B., Embley, T. M. & Takii, S. (1997).** Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the occurrence and selection of sulfate-reducing bacteria in response to nutrient addition to sediment slurry microcosms from a Japanese estuary. *FEMS Microbiology Ecology* **24**, 221–234.

R

- Rabus, R. & Widdel, F. (1995).** Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch Microbiol* **164**, 448–451.
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W. & Widdel, F. (1993).** Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1444–1451.
- Rabus, R., Hansen, T. A. & Widdel, F. (2006).** Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In *The Prokaryotes*, pp. 659–768. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York, NY: Springer New York.

- Raghukumar, C., Vipparthy, V., David, J. J. & Chandramohan, D. (2001).** Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**, 433–436.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., Janssen, P. H., Hippe, H. & Stackebrandt, E. (1996).** *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology (Reading, Engl)* **142** (Pt 8), 2087–2095.
- Ramos, A. R., Keller, K. L., Wall, J. D. & Pereira, I. A. C. (2012).** The Membrane QmoABC Complex Interacts Directly with the Dissimilatory Adenosine 5'-Phosphosulfate Reductase in Sulfate Reducing Bacteria. *Front Microbiol* **3**, 137.
- Ranchou-Peyruse, A., Moppert, X., Hourcade, E., Hernandez, G., Caumette, P. & Guyoneaud, R. (2004).** Characterization of brackish anaerobic bacteria involved in hydrocarbon degradation: A combination of molecular and culture-based approaches. *Ophelia* **58**, 255–262.
- Ranchou-Peyruse, A., Herbert, R., Caumette, P. & Guyoneaud, R. (2006).** Comparison of cultivation-dependent and molecular methods for studying the diversity of anoxygenic purple phototrophs in sediments of an eutrophic brackish lagoon. *Environ Microbiol* **8**, 1590–1599.
- R Development Core Team. (2013).** *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Revsbech, N. P., JøRgensen, B. B., Blackburn, T. H. & Cohen, Y. (1983).** Microelectrode studies of the photosynthesis and O₂, H₂S, and pH profiles of a microbial mat. *Limnology and Oceanography* **28**, 1062–1074.
- Rigaud, S., Di Giorgio, C., Radakovitch, O., Garnier, J.-M. & De Meo, M. (2012).** Genotoxicity of sediment extracts of the Berre lagoon (France). *Chemosphere* **88**, 937–944.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J.-F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K. & other authors. (2013).** Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* **499**, 431–437.
- Risgaard-Petersen, N. (2003).** Coupled nitrification-denitrification in autotrophic and heterotrophic estuarine sediments: On the influence of benthic microalgae. *Limnol Oceanogr* **48**, 93–105.
- Ritalahti, K. M., Amos, B. K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S. S. & Löffler, F. E. (2006).** Quantitative PCR Targeting 16S rRNA and Reductive Dehalogenase Genes Simultaneously Monitors Multiple Dehalococoides Strains. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2765–2774.
- Robertson, C. E., Spear, J. R., Harris, J. K. & Pace, N. R. (2009).** Diversity and Stratification of Archaea in a Hypersaline Microbial Mat. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1801–1810.
- Robertson, L. A. & Kuenen, J. G. (2006).** The Colorless Sulfur Bacteria. In *The Prokaryotes*, pp. 985–1011. Edited by M. D. P. Dr, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. Springer New York.
- Roeselers, G., Norris, T. B., Castenholz, R. W., Rysgaard, S., Glud, R. N., Kühl, M. & Muyzer, G. (2007).** Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). *Environ Microbiol* **9**, 26–38.

Ross, S. M. (1994). *Toxic metals in soil-plant systems*. John Wiley & Sons Ltd.

Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P. & Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4704–4712.

S

Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. & Kamagata, Y. (2008). *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage ‘Rice Cluster I’, and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 929–936.

Sánchez, O., Diestra, E., Esteve, I. & Mas, J. (2005). Molecular characterization of an oil-degrading cyanobacterial consortium. *Microb Ecol* **50**, 580–588.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H. & other authors. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7537–7541.

Schneider, D., Arp, G., Reimer, A., Reitner, J. & Daniel, R. (2013). Phylogenetic Analysis of a Microbialite-Forming Microbial Mat from a Hypersaline Lake of the Kiritimati Atoll, Central Pacific. *PLoS ONE* **8**, e66662.

Selesi, D., Schmid, M. & Hartmann, A. (2005). Diversity of green-like and red-like ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes (cbbL) in differently managed agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 175–184.

Severin, I. & Stal, L. J. (2010). Diazotrophic Microbial Mats. In *Microbial Mats*, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, pp. 321–339. Edited by J. Seckbach & A. Oren. Springer Netherlands.

Severin, I., Acinas, S. G. & Stal, L. J. (2010). Diversity of nitrogen-fixing bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol Ecol* **73**, 514–525.

Sigalevich, P., Meshorer, E., Helman, Y. & Cohen, Y. (2000). Transition from anaerobic to aerobic growth conditions for the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxycliniae* results in flocculation. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5005–5012.

Silver, S. & Phung, L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**, 587–605.

Soergel, D. A. W., Dey, N., Knight, R. & Brenner, S. E. (2012). Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *The ISME Journal* **6**, 1440–1444.

Sole, A., Diestra, E. & Esteve, I. (2009). Confocal Laser Scanning Microscopy Image Analysis for Cyanobacterial Biomass Determined at Microscale Level in Different Microbial Mats. *Microb Ecol* **57**, 649–656.

Sorkhoh, N., Al-Hasan, R., Radwan, S. & Höpner, T. (1992). Self-cleaning of the Gulf. *Nature* **359**, 109–109.

- Spiridonova, E. M., Berg, I. A., Kolganova, T. V., Ivanovsky, R. N., Kuznetsov, B. B. & Tourova, T. P. (2004).** An oligonucleotide primer system for amplification of the ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes of bacteria of various taxonomic groups. *Microbiology* **73**, 316–325.
- Spormann, A. M. & Widdel, F. (2000).** Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**, 85–105.
- Stackebrandt, E. & Rainey, F. A. (1995).** Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, pp. 259–275. Edited by A. D. L. Akkermans, J. D. V. Elsas & F. J. D. Bruijn. Springer Netherlands.
- Stal, L. J. (1994).** Microbial mats in coastal environments. In *Microbial Mats*, NATO ASI Series, pp. 21–32. Edited by L. J. Stal & P. Caumette. Springer Berlin Heidelberg.
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., Jézéquel, R., Barantal, S., Cuny, P., Gilbert, F., Cagnon, C., Militon, C., Amouroux, D. & other authors. (2013).** Impact of Oil on Bacterial Community Structure in Bioturbated Sediments. *PLoS ONE* **8**, e65347.
- Steinberg, L. M. & Regan, J. M. (2008).** Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities from an Acidic, Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6663–6671.
- Steinberg, L. M. & Regan, J. M. (2009).** mcrA-Targeted Real-Time Quantitative PCR Method To Examine Methanogen Communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 4435–4442.
- Steppe, T. F. & Paerl, H. W. (2005).** Nitrogenase activity and nifH expression in a marine intertidal microbial mat. *Microb Ecol* **49**, 315–324.
- Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135–138.
- Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A. & Ueki, K. (2007).** *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, rod-like, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 520–526.
- Syakti, A. D. (2004).** *Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipidiques de bactéries hydrocarbonoclastes marines*. Aix-Marseille 3.
- Szewzyk, R. & Pfennig, N. (1987).** Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov. *Arch Microbiol* **147**, 163–168.

T

- Tabita, F. R. (1995).** The Biochemistry and Metabolic Regulation of Carbon Metabolism and CO₂ Fixation in Purple Bacteria. In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, Advances in Photosynthesis and Respiration, pp. 885–914. Edited by R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer. Springer Netherlands.
- Tabita, F. R. (1999).** Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A different perspective. *Photosynthesis Research* **60**, 1–28.
- Takai, K. & Horikoshi, K. (2000).** Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5066–5072.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.
- Tissot, B. P. & Welte, D. H. (1978).** Petroleum formation and occurrence: a new approach to oil and gas exploration.
- Tourova, T. P., Spiridonova, E. M., Berg, I. A., Kuznetsov, B. B. & Sorokin, D. Y. (2006).** Occurrence, phylogeny and evolution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria of the genera *Thiomicrospira* and *Thioalkalimicrobium*. *Microbiology (Reading, Engl)* **152**, 2159–2169.

V

- Vandecasteele, J.-P. (2005).** *Microbiologie pétrolière: concepts, implications environnementales, applications industrielles*. Paris: Technip.
- Vincent, W. F. (2002).** Cyanobacterial Dominance in the Polar Regions. In *The Ecology of Cyanobacteria*, pp. 321–340. Edited by B. A. Whitton & M. Potts. Springer Netherlands.
- Visscher, P. T., Reid, R. P., Bebout, B. M., Hoefft, S. E., Macintyre, I. G. & Thompson, J. A. (1998).** Formation of lithified micritic laminae in modern marine stromatolites (Bahamas); the role of sulfur cycling. *American Mineralogist* **83**, 1482–1493.

W

- Wagner, M., Roger, A. J., Flax, J. L., Brusseau, G. A. & Stahl, D. A. (1998).** Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *J Bacteriol* **180**, 2975–2982.
- Wang, Q., Quensen, J. F., Fish, J. A., Lee, T. K., Sun, Y., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. (2013).** Ecological Patterns of *nifH* Genes in Four Terrestrial Climatic Zones Explored with Targeted Metagenomics Using FrameBot, a New Informatics Tool. *mBio* **4**, e00592–13.
- Watanabe, K. & Baker, P. W. (2000).** Environmentally relevant microorganisms. *J Biosci Bioeng* **89**, 1–11.
- Watanabe, T., Kojima, H., Takano, Y. & Fukui, M. (2013).** Diversity of sulfur-cycle prokaryotes in freshwater lake sediments investigated using *aprA* as the functional marker gene. *Systematic and Applied Microbiology* **36**, 436–443.
- Watkins, A. J., Roussel, E. G., Parkes, R. J. & Sass, H. (2014).** Glycine Betaine as a Direct Substrate for Methanogens (*Methanococoides* spp.). *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 289–293.
- Watkins, A. J., Roussel, E. G., Webster, G., Parkes, R. J. & Sass, H. (2012).** Choline and N,N-Dimethylethanolamine as Direct Substrates for Methanogens. *Appl Environ Microbiol* **78**, 8298–8303.
- Wertz, S., Poly, F., Le Roux, X. & Degrange, V. (2008).** Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of Nitrobacter-like *nxrA* sequences in soil. *FEMS Microbiol Ecol* **63**, 261–271.

- Widdel, F. & Hansen, T. A. (1992).** The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. 582–624.
- Widdel, F. & Bak, F. (1992).** Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria. In *The Prokaryotes*, pp. 3352–3378. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. Springer New York.
- Widdel, F. & Rabus, R. (2001).** Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 259–276.
- Wieland, A., Zopfi, J., Benthien, M. & Köhl, M. (2005).** Biogeochemistry of an iron-rich hypersaline microbial mat (Camargue, France). *Microb Ecol* **49**, 34–49.
- Van der Wielen, P. W. J. J. (2006).** Diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes in the MgCl₂-dominated deep hypersaline anoxic basin discovery. *FEMS Microbiol Lett* **259**, 326–331.
- Wolcott, R. D., Gontcharova, V., Sun, Y., Zischakau, A. & Dowd, S. E. (2009).** Bacterial diversity in surgical site infections: not just aerobic cocci any more. *J Wound Care* **18**, 317–323.
- Wu, Z., Wang, X. & Zhang, X. (2011).** Using non-uniform read distribution models to improve isoform expression inference in RNA-Seq. *Bioinformatics* **27**, 502–508.

X

- Xiao, K.-Q., Bao, P., Bao, Q.-L., Jia, Y., Huang, F.-Y., Su, J.-Q. & Zhu, Y.-G. (2014).** Quantitative analyses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large-subunit genes (cbbL) in typical paddy soils. *FEMS Microbiology Ecology* **87**, 89–101.

Y

- Yan, T., Fields, M. W., Wu, L., Zu, Y., Tiedje, J. M. & Zhou, J. (2003).** Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (nirK and nirS) from nitrate- and uranium-contaminated groundwater. *Environ Microbiol* **5**, 13–24.
- Yap, W. H., Zhang, Z. & Wang, Y. (1999).** Distinct Types of rRNA Operons Exist in the Genome of the Actinomycete *Thermomonospora chromogena* and Evidence for Horizontal Transfer of an Entire rRNA Operon. *J Bacteriol* **181**, 5201–5209.
- Yoshinari, T. & Knowles, R. (1976).** Acetylene Inhibition of Nitrous-Oxide Reduction by Denitrifying Bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **69**, 705–710.

Z

- Zaghmouri, I., Michotey, V. D., Guasco, S., Raimbault, P., Garcia, N., Bernard, G. & Bonin, P. C. (2013).** Trends in salinity and inorganic nitrogen compounds in the Berre lagoon (1994–2011) bacterial activities and nitrogen budgets. *Marine Pollution Bulletin* **67**, 55–65.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M. & Steward, G. F. (2003).** Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology* **5**, 539–554.
- Zelege, J., Sheng, Q., Wang, J.-G., Huang, M.-Y., Xia, F., Wu, J.-H. & Quan, Z.-X. (2013).** Effects of *Spartina alterniflora* invasion on the communities of methanogens

- and sulfate-reducing bacteria in estuarine marsh sediments. *Spartina alterniflora* **4**, 243.
- Zeyer, J., Kuhn, E. P. & Schwarzenbach, R. P. (1986).** Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl Environ Microbiol* **52**, 944–947.
- Zhang, L.-M., Hu, H.-W., Shen, J.-P. & He, J.-Z. (2012).** Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *ISME J* **6**, 1032–1045.
- Zumft, W. G. (1997).** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 533–616.

Résumé

Ubiquitaires et très anciens, les communautés des tapis microbiens font preuve de capacités métaboliques et adaptatives très importantes. Situés en zone côtières, ces écosystèmes peuvent être soumis à des contaminations pétrolières. Dans ce contexte, cette étude vise d'une part à décrire la structure et le fonctionnement de tapis microbiens et d'autre part à comprendre l'impact d'une contamination pétrolière sur ces écosystèmes. Cette étude porte sur deux tapis microbiens de l'étang de Berre aux paramètres physico-chimiques proches mais présentant des contaminations pétrolières contrastées. Le fonctionnement du système étant tributaire d'autres facteurs tels que la lumière et les saisons, les variations saisonnières et nyctémérales ont été prises en compte dans cette étude. Un accent particulier a également été porté sur le cycle du soufre de par son importance en milieu marin. Les résultats de cette étude mettent en évidence des structures de communautés différentes entre les deux tapis au niveau global, la séparation spatiale prévalant sur la séparation saisonnière. La fraction active de la communauté du site contaminé présente une évolution linéaire tandis que celle du site témoins suit pour sa part les variations saisonnières. Au niveau du site contaminé une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures couplée à une biodégradation des hydrocarbures suggère que le tapis contaminé est adapté à la contamination pétrolière. Malgré les différences de structures et d'activités de dégradation, des profils métaboliques très semblables sont cependant observables entre les deux tapis, avec des fonctions similaires laissant supposer une redondance fonctionnelle. Des variations saisonnières et nyctémérales ont également été observées avec notamment des *Desulfobulbaceae* plus abondantes au printemps et plus actives en journée. Des études culturelles ont été réalisées en parallèle. Elles permettront d'appréhender de manière complémentaire la dynamique des communautés des sulfato-réducteurs au sein du tapis et de mieux comprendre les variations mises en évidence dans cette étude.

Mots clés : Tapis microbiens, hydrocarbures, séquençage haut débit, structure des communautés ; activités métaboliques, cycles biogéochimiques, bactéries sulfato-réductrices.

Abstract

Ubiquitous and very ancient, the microbial mats communities demonstrate very important metabolic and adaptive capacities. Located in the coastal area, these ecosystems may be subject to oil contamination. In this context, the aim of this study is on one hand to describe the structure and functioning of microbial mats and on the other to understand the impact of oil contamination on these ecosystems. This study focused on two microbial mats from the Berre lagoon with close physical chemical parameters but with contrasted hydrocarbon contamination levels. The functioning of the system is dependent on other factors such as light and seasons, diurnal and seasonal variations were taken into account in this study. Special emphasis was placed on the sulfur cycle due to its importance in the marine environments. The results of this study highlighted different communities' structures at the global level between both mats, the spatial variation prevailed on seasonal variation. The active part of the community from the contaminated site shows a linear trend while that one of the uncontaminated site follows the seasonal variations. The contaminated site shows genes involved in hydrocarbon degradation more expressed coupled to a hydrocarbon biodegradation suggesting that the contaminated mat is adapted to the petroleum contamination. Despite these differences in the structure and the degradation capacities, very similar metabolic profiles are observed between the two mats with similar functions, suggesting functional redundancy. Seasonal and diurnal variation was also observed, the *Desulfobulbaceae* were particularly more abundant in spring and more active during the day. A complementary cultural approach will allow to better understanding the dynamics of sulfate-reducers communities in the mat and comprehending these variations.

Key words: Microbial mats, hydrocarbons, high throughput sequencing, community structure, metabolic activity; biogeochemical cycles, sulfate reducing bacteria.