Utilisation de la génomique en microbiologie et en écologie microbienne

Valerie Barbe

▶ **To cite this version:**

Valerie Barbe. Utilisation de la génomique en microbiologie et en écologie microbienne. Sciences du Vivant [q-bio]. l'Université Paris-Saclay, 2022. tel-04330922

HAL Id: tel-04330922
https://hal.science/tel-04330922

Submitted on 8 Dec 2023

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

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

Habilitation à diriger des recherches

université PARIS-SACLAY

UTILISATION DE LA GENOMIQUE EN MICROBIOLOGIE ET EN ECOLOGIE MICROBIENNE

Habilitation à diriger des recherches de l'Université Paris-Saclay

présentée et soutenue à Evry, le 15 juin 2022, par

Valérie Puzos-Barbe

Composition du jury

Mme Cécile Fairhead Professeure de Paris-Saclay	Rapportrice
Mme Virginie Chapon Equivalence Directeur de recherche au CEA	Rapportrice
Mr. Jean-François Briand Maître de conférence de l'Université de Toulon	Rapporteur
Mr. Alexis Bazire Maître de conférence de l'UBS	Examinateur
Mr. Jean-François Ghiglione Directeur de recherche CNRS PSU	Examinateur
Mr. Patrick Wincker Directeur de recherche, Responsable du Genoscope	Examinateur

université
PARIS-SACLAY

Titre : titre (en français).... Utilisation de la génomique en microbiologie et en écologie microbienne.....

Mots clés : Génomique (OMICs), Cartographie optique, Ecologie microbienne, Pollution plastique

Résumé : La génomique est une science moderne qui a eu son essor grâce à l'évolution des technologies de séquençage et de cartographie optique. En seulement quelques années nous sommes passés de l'étude d'un gène à celle de tout un écosystème complexe. Les connaissances qui en découlent sont multiples et touchent un très large éventail des domaines de la biologie : la microbiologie, la santé, l'agronomie, l'écologie, la paléontologie, l'écotoxicologie...., allant du fondamental à l'appliqué. Les connaissances apportées par la génomique a permis dans un premier temps de mieux comprendre le fonctionnement des génomes et ouvre désormais la possibilité d'étudier les relations existantes entre les organismes d'un écosystème.

Dans ce mémoire, je vais vous présenter diverses utilisations de la génomique pour répondre à des questions scientifiques différentes. La comparaison de la mise en évidence de variants structuraux chez les plantes, l'étude d'un écosystème anthropique, l'analyse des acteurs principaux qui le composent et la recherche de solutions alternatives aux plastiques conventionnels qui sont responsables d'une pollution émergente, seront abordés.

Title : Titre (en anglais).... Use of genomics in microbiology and microbial ecology

Keywords : Genomics (OMICs), Optical mapping, Microbial ecology, Plastic pollution

Abstract : Genomics is a modern science that has taken off thanks to the evolution of sequencing and optical mapping technologies. In just a few years, we have gone from studying a gene to studying an entire complex ecosystem. The resulting knowledge is multiple and affects a very wide range of fields of biology: microbiology, health, agronomy, ecology, paleontology, ecotoxicology, etc., ranging from fundamental to applied. The knowledge provided by genomics initially made it possible to better understand the functioning of genomes and now opens up the possibility of studying the existing relationships between organisms in an ecosystem.

In this manuscript, I will present various uses of genomics to answer different scientific questions. Comparison of the highlight of structural variants in plants, the study of an anthropogenic ecosystem, the analysis of the main actors that compose it and the search for alternative solutions to conventional plastics which are responsible for emerging pollution, will be discussed.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement tous ceux qui ont eu confiance en moi et m'ont encouragée à m'engager vers cette HDR : je ne vais pas les nommer, ils se reconnaîtront.

Je tiens ensuite à remercier les membres du jury, et tout particulièrement Mme Cécile Fairhead, Mme Virginie Chapon et Mr. Jean-François Briand d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je tiens à remercier particulièrement Patrick et Jean-François G. qui m'ont fait confiance et m'ont soutenue dans mes choix.

Je remercie Anne Zaparucha, responsable du laboratoire L2BMS auquel je suis rattachée, pour ses conseils lors de l'écriture de ce manuscrit.

Je remercie également tous mes collègues du Genoscope avec qui je travaille depuis plusieurs années : bonne humeur, disponibilité, compétences font partie de leur quotidien.

Sophie M., Benoît, Sophie O., Adriana, Céline, Laurie, Patricia, Ivan, Barbara, Zineb, Stéphanie, Ghislaine, Nathalie : ce fût un vrai plaisir de travailler avec vous. Vous étiez une « Dream team » et le travail effectué était de grande valeur. S'il y a bien une chose que je regrette dans mon changement de carrière, c'est de ne plus travailler avec vous. Mais heureusement, il reste les pauses cafés (quand celles-ci sont permises ;-)).

Je tiens aussi à remercier Fabien Joux, directeur du LOMIC, et toute l'équipe ainsi que tous les employés de l'Observatoire Océanologique de Banyuls pour leur accueil, leur disponibilité, leur aide et leurs conseils apportés depuis le début de la collaboration.

Evelyne et Richard : où que vous soyez, je sais que vous auriez été fiers.

Pour finir, je tiens à remercier mes enfants, mes parents, mes frères et sœurs de sang ou de cœur, mes amis, et l'homme qui partage ma vie depuis ces dernières années. Merci pour votre soutien, d'être prévenants, à l'écoute et de prendre soin de moi.

A tous ceux qui me sont proches

Table des matières

Table des figures/tableaux **5**

Préambule **7**

Curriculum vitae **9**

Encadrement de recherche et de développement technologiques **11**

I. Encadrement 11

II. Enseignements et formations 12

III. Membre de jurys d'examens 13

Partenariat dans des projets **14**

I. Conduite et suivi de projets 14

II. Missions 14

III. Organisation de colloques, conférences 16

Diffusion du travail : publications et congrès **18**

I. Publications à comité de lecture 18

II. Communications orales et posters présentés lors de conférences nationales ou internationales 19

III. Demande de financements 21

Communiqués de presse, vulgarisation et responsabilité collective **22**

I. Communiqués de presse : 22

II. Vulgarisation scientifique 22

III. Participation à la mise en place de réseaux scientifiques 23

Activités de recherche **25**

I. Introduction 25

II. Comparaison de technologies pour la détection de variations structurales chez les plantes 29

1. Technologie Oxford nanopore (ONT) 29

2. Cartographie optique 30

3. Variations structurales 32

4. Quelle technologie utiliser pour la détection des variations structurales : ONT ou Bionano ? A chacune ses objectifs ! 34

III. Les microplastiques en milieu marin 37

1. Contexte de la pollution plastique en milieu marin 37

2. La plastisphère 38

3. La dégradation des plastiques 39

4. De l'analyse de la plastisphère aux preuves de dégradations 41

IV. La biodégradation des polyhydroxyalcanoates (PHA) 44

1. PHA : Polymères biosourcés et biodégradables 44

2. Alteromonas sp. : dégradeur de PHA ? 47
A. Alteromonas sp. appartient à une nouvelle espèce 47
B. La dégradation du PHBV par Alteromonas sp. 50
a. Paramètres biologiques et physico-chimiques 50
i. Consommation d'oxygène 50
ii. Souche activité bactérienne 51
iii. Perte de poids 52
iv. Image de microscopie électronique à balayage 52
b. Analyse génomique 53
c. Analyse transcriptomique 55
d. Conclusion 61
3. De l'identification à l'activité enzymatique 62
4. A chaque polymère ses dégradeurs ? 63
V. Projet de recherche : De la colonisation aux processus de dégradation des plastiques en milieu marin 67
1. Contexte du projet de recherche 67
2. Déroulement du projet 68
A. Isolement de souches intervenant dans la biodégradation des polymères 69
B. Recherche de biodégradeurs par ^{13}C DNA-SIP 70
C. Génomique comparative : Organisation génique, voies métaboliques, identification des enzymes 72
D. Synthèse des enzymes et Activité enzymatique 73
E. Procédé amélioré 73
F. Analyse du suivi de la plastisphère 74
3. Calendrier 75
4. Conclusion 76
Conclusion Générale 78
Références Bibiographiques 80
Annexes 92

Table des figures/tableaux

Figure 1 : Nombre de citations (A) et de publications (B) par an sur les 10 dernières années.

Figure 2 : Vue des axes de recherches de la communauté du réseau PLASTnet dans le cadre de l'économie circulaire du plastique.

Figure 3 : Evolution du séquençage en 15 ans, en termes de production de séquences et du coût de la base (ressource NIH).

Figure 4 : Methodologie Pacific Bioscience. (A) Une ADN polymérase est fixée au fond d'un nano-puit (~70nm). (B) A chaque incorporation d'un nucléotide marqué (les 4 bases ont un marquage different), il y a une illumination par le fond du puit pour la détection du dNTP incorporé. (C) Séquenceur PacBio RSII.

Figure 5 : Technologie Oxford Nanopore Technology (ONT). (A) Séquenceur Minion. (B) Pore protéïque laissant passer la molécule d'ADN. Le signal de différence de potentiel mesuré correspond au passage de 5 bases dans le pore.

Figure 6 : Comparaison de deux systèmes de cartographie optique : le système Argus et Irys.

Figure 7 : Evolution des méthodes utilisées pour la caractérisation des variations structurales. (A) Observation au microscope, (B) CGH, (C) SNP, (D) Séquençage et cartographie optique.

Figure 8 : Phases successives de la formation d'un biofilm bactérien.

Figure 9 : Schéma représentant les étapes de la biodégradation des plastiques en milieu marin.

Figure 10 : Comparaison des différents environnements influençant le taux de biodégradation des plastiques.

Figure 11 : Schéma représentant les différentes classes de plastiques selon leur origine et leur biodégradabilité.

Figure 12 : Mécanisme simplifié de biosynthèse des PHA (R = CnH2n+1).

Figure 13 : Présentation des deux groupes de ePhaZ spécifique des PHAscl catégorisés en fonctions du placement de l'histidine (oxyanion hole) par rapport à la triade catalytique (Serine, Asparagine, Histidine).

Figure 14 : Arbre phylogénétique de l'ARNr 16S comparant différents taxons à notre souche d'intérêt. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode de jointure voisine avec le logiciel MEGA7.

Figure 15 : Concentration d'oxygène dissous pendant l'incubation exprimée en µmol d'oxygène dissous/l par jour. ASM-PHBV et ASM sont les témoins négatifs.

Figure 16 : Production bactérienne de la souche lors de l'incubation en milieu artificiel d'eau de mer (ASM) pour : (A) le contrôle négatif ASM-str et le surnageant de l'échantillon ASM-str-PHBV exprimé en ng C/l/h. (B) l'échantillon ASM-str-PHBV et le contrôle négatif ASM-PHBV exprimés en ng C/m²/h. Les points de prélèvement étaient le début d'incubation J0, après 5 jours (J5), après 11 jours (J11), après 16 jours (J16), après 32 jours (J32) et le point final à 40 jours (J40).

Figure 17 : Images de microscopie à balayage du PHBV au début de l'expérience (J0) et après 5 jours (J5) ou 40 jours (J40) de culture avec la souche dans le milieu artificiel. Des sphérulites sont observées sur le PHBV après 40 jours d'incubation.

Figure 18 : Représentation schématique du cluster de gènes impliqués dans la dégradation extracellulaire des PHA.

Figure 19 : Vision générale de l'analyse transcriptomique d'Alteromonas sp. En condition d'utilisation du PHBV comme seule source de carbone.

Figure 20 : Biodégradation du PHBV par Alteromonas sp.

Figure 21 : Activation de la voie de la β-oxydation en condition PHBV permettant de cliver les acides gras en acétyl-CoA et de générer des porteurs d'électrons sous forme réduite.

Figure 22 : Cycle de Krebs et shunt du Glyoxylate. Alteromonas sp. Semble préfrérentiellement utiliser le shunt du glyoxylate lors de l'assimilation du PHBV comme source de carbone.

Figure 23 : Suivi en fonction du temps de l'activité enzymatique des dépolymérases extracellulaires de Ralstonia pickettii T1, Alcaligenes faecalis AE122 et Alteromonas sp.

Figure 24 : Développement des communautés bactériennes et formation des halos de dégradation à partir des inoculums issus des différents types de PHA cultivés sur une boite gélosée de milieu minimum contenant du PHBV (Vert, PHBHHx94 ; Jaune, PHOHHx ; Gris, PHBV89 ; Noir, PHOHHp ; Rouge, PHBV95).

Figure 25 : Vue d'ensemble du déroulement du projet de recherche proposé « De la colonisation aux processus de dégradation des plastiques en milieu marin ».

Figure 26 : Schéma expérimental de l'expérience DNA-SIP permettant de différentier les biodégradeurs (fraction lourde) des opportunistes (fraction légère).

Tableau 1 : Comparatif de la technologie de séquençage ONT et celle de cartographie optique de Bionano Genomics pour la detection des variations structurales.

Tabeau 2 : Classifications des différents PHA. La nature du groupe est associée à la chaine latérale R directement reliée aux substrats carbonés (glucose, fructose, cellulose, acides et acides gras…) utilisé par le micro-organisme et à la nature de son enzyme PHA synthase.

Tableau 3 : Caractéristiques générales du génome d'Alteromonas sp.

Tableau 4 : Résultats des meilleures comparaisons entre toutes les protéines d'Alteromonas sp. et celles des dépolymérases extracellulaires de la base DED.

Tableau 5 : Caractéristiques des différents types de plastiques PHA utilisés lors de l'expérience (HB, hydroxybutyrate ; HHx, hydroxyhexanoate ; HV, hydroxyvalerate ; HO, hydroxyoctanoate ; HHp, hydroxyheptanoate). Dans la production de PHNac, il a été ajouté de l'acide acrylique (inhibiteur beta-oxidation) au substrat afin de se rapprocher d'un homopolymère en HN. Non applicable. Polymères fournis par Stéphane Bruzaud, IRDL, Lorient.

Préambule

Ce mémoire retrace les activités de recherche que j'ai menées depuis ma thèse et tout au long de ma carrière effectuée au Genoscope. Le Genoscope est le centre national de séquençage spécialement créé en 1997, pour une durée de 10 ans, pour la contribution française au séquençage du génome humain. Devenu une référence nationale et internationale pour la qualité des données produites, le Génoscope a poursuivi son chemin en intégrant le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA) en 2007. Composé des Laboratoires de Séquençage (LS) et d'Informatique Scientifique (LIS) ainsi que de l'Unité Mixte de Recherche "Génomique Métabolique" (UMR8030), le Genoscope, dirigé par Patrick Wincker, constitue désormais un service au sein de l'Institut de biologie François Jacob du CEA.

Dès mon arrivée, à la création du Genoscope, ma mission a été de mettre en œuvre des technologies allant de la biologie moléculaire à la bioinformatique pour obtenir la meilleure qualité possible des séquences génomiques produites par le Centre. Mes armes, je les ai faites sous la direction de Roland Heilig lors du séquençage complet du génome de l'archae hyperthermophile *Pyrococcus abyssis* GE5 et celui du Chr 14 du génome humain. C'est en 2000 que Jean Weissenbach, directeur du Genoscope de l'époque, m'a confié la responsabilité du Laboratoire de Finition (LF) dont la mission première était de prendre en charge l'assemblage et la finition du séquençage *de novo* de génomes microbiens (< 20 Mb). En 2015, le LF a été restructuré pour donner naissance au Laboratoire de Biologie Moléculaire pour l'Etude des Génomes (LBIOMEG) qui assurait une veille technologique et développait de nouvelles méthodes (et /ou protocoles) de biologie moléculaire appliqué(e)s au domaine de la génomique. Ce Laboratoire se trouvait à l'interface entre le LS pour lequel nous mettions en place certains protocoles, le LIS qui nous apportait du soutien aussi bien en termes de système qu'en bioinformatique et le Laboratoire d'Analyse Génomique des Eucaryotes (LAGE), pour lequel nous apportions notre expertise pour l'amélioration des assemblages et une validation *in vitro* de prédictions *in silico*. J'ai dirigé ce Laboratoire jusqu'en juillet 2018.

Pendant une grande partie de ma carrière, j'ai été responsable d'un laboratoire appartenant à la partie « Plateforme » du Genoscope. Je me suis toujours attelée à ce que ce laboratoire soit à la hauteur des exigences demandées en développant des méthodologies adaptées aux évolutions du séquençage et surtout en essayant d'être innovante. Mais mon rôle de responsable ne se limitait pas simplement à faire évoluer le Laboratoire. Depuis sa création, le Genoscope travaille en collaboration avec des organismes académiques qui soumettent des projets soit *via* des appels à proposition, soit dans le cadre de projets pour lesquels les collaborateurs contribuent financièrement au séquençage, soit encore en tant que partenaire lors de demandes de financement principalement à l'agence nationale de la recherche (ANR). A ce jour, j'ai eu la responsabilité de plus de 120 projets correspondant principalement au séquençage d'un ou de plusieurs (méta)génomes procaryotes (totalisant plus de 220 (méta)génomes). Mes références

bibliographiques (Annexe 1) permet d'avoir un aperçu de la diversité de ces différents projets. Par ailleurs, au début des années 2000, le LF étant l'un des seuls laboratoires en France à faire de la finition de génomes microbiens, j'ai eu un rôle de consultante et le Laboratoire a accueilli et formé des équipes collaboratrices.

En tant que Ingénieure-Chercheure du CEA, je me suis tout naturellement et très régulièrement impliquée dans la réflexion de l'analyse des (méta)génomes des projets que j'avais en collaboration. En parallèle, j'ai développé de la recherche et développement au sein du laboratoire, comme par exemple l'amélioration de l'extraction d'ADN de très haut poids moléculaire (>100kb) qui est un vrai défi chez les plantes lié à la présence de métabolites secondaires. Ce n'est que récemment que j'ai souhaité orienter ma carrière pour développer mon propre sujet de recherche. Les activités de recherche que je vais vous présenter dans ce mémoire s'inscrivent dans ce cadre et concerne : (i) l'utilisation d'instruments de cartographie optique pour répondre à des questions scientifiques, (ii) l'étude de la pollution des plastiques en milieu marin et (iii) la recherche de solutions alternatives aux plastiques conventionels. Pour finir ces activités, je vous proposerai un projet de recherche présentant plusieurs axes pour aborder des solutions alternatives aux plastiques conventionnels.

Curriculum vitae

Nom : Puzos Barbe
Prénom : Valérie
Date de Naissance : 16 mars 1969

Coordonnées professionnelles :

CEA/Genoscope & CNRS-UMR 8030 / L2BMS

2, rue Gaston Crémieux, 91057 Evry Cedex

✉ vbarbe@genoscope.cns.fr

Coordonnées personnelles

7 rue Jean Bouin

66650 Banyuls sur mer

☎ (+33) (0)6 61 50 90 56

Compétences

- Microbiologie, biologie moléculaire, génomique et écologie
- Séquençage et assemblage de génomes microbiens
- Bioanalyse et valorisation de résultats de séquençage (meta)barcoding (étude de la diversité), (méta)génomique (annotation fonctionnelle, génomique comparée, reconstruction de MAG…), et (méta)transcriptomique (prédiction de réseaux métabolique, analyse de familles d'enzymes….)
- Utilisation d'outils/programmes sous UNIX
- Développement de méthodes et/ou de protocoles dans le cadre d'activités de recherche et développement

Diplômes universitaires

- 1991 : Licence de Biochimie, Université de Paris XI, Orsay
- 1993 : Maîtrise de Génétique Moléculaire, Université Paris XI, Orsay
- 1994 : DEA de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université Paris XI, Orsay
- 2007 : Doctorat, spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Val d'Essonne, Evry

Parcours professionnel

- De 1997 à 2000 : Ingénieure au Genoscope, sous la responsabilité du Dr. Roland Heilig. Participation à l'assemblage et à la finition de génomes microbiens

- De 2000 à 2014 : **Direction** du **L**aboratoire de **F**inition (LF), Genoscope, sous la direction de Jean Weissenbach
- De 2015 à 2018 : **Direction** du **L**aboratoire de **Bio**logie **M**oléculaire pour l'**E**tude des **G**énomes (**LBioMEG**), Genoscope, sous la direction de Patrick Wincker (Directeur du Genoscope)
- Depuis 2018 :
  - Chercheuse au Laboratoire de Biocatalyse, Biorémédiation et Métabolisme Synthétique (L2BMS, Dir Anne Zaparucha), CEA/DRF/Genoscope & CNRS UMR8030 « Génomique métabolique » (Dir. Patrick Wincker).
  - Mission longue durée au **L**aboratoire d'**O**céanographie **Mic**robienne (LOMIC, UMR 7621, Dir Fabien Joux) à l'Observatoire Océanographique de Banyuls. Travaille en collaboration avec Jean-François Ghiglione.

Evaluations de publications scientifiques

Révision de publications pour BMC Genomics, BMC Microbiology, Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports, PLoS Genetics, BioTechniques

Centres d'intérêt

- Plongée subaquatique en bouteille à l'air :
  - Guide de palanquée, initiateur technique (FFESSM, E2)
  - Formateur Environnement et Bio (FFESSM, FB2)

Encadrement de recherche et de développement technologiques

I. Encadrement

Chercheur(e)s en CDD:

- Wahiba BERRABAH (2014 à 2017) : Mise en place (au niveau expérimental et bio-analyse) des systèmes de cartographie optique développés par Bionano Genomics.
- Erwan Denis (2016 à 2018) : Développements de préparation d'ADN génomique de très haut poids moléculaire (>100kb) chez les plantes pour une utilisation lors de séquençage longues lectures (Oxford Nanopore Technology) et de cartes optiques (Bionano Genomics).

Thèses

- Depuis mai 2021 : Co-encadrement de Gabrielle Derippe, co-directeurs de thèse Jean-François Ghiglione et Stéphane Bruzaud.
- De 2018 à 2020 : Co-encadrement de Justine Jacquin, directeur de thèse Jean-François Ghiglione. Soutenance de thèse de Sorbonne Université intitulée « Ecotoxicologie microbienne des plastiques en mer : colonisation et biodégradation par la plastisphère » le 16 octobre 2020.

Masters

- Depuis janvier 2022 :
    - Safa Habichy, M2 « Biologie », parcours Biologie des organismes et des populations, Institut universitaire européen de la mer, Université de Bretagne occidentale
    - Florent Poubanne, M2 « Microbiologie Fondamentale », parcours Biologie et Santé, Université Paris-Saclay
- De janvier à juin 2021 : Adèle Wolinski, M2. Master « Biodiversité, Écologie, Évolution », parcours ÉcoPhysiologie et ÉcoToxicologie, Sorbonne-Université
- D'avril à juin 2021 : Adèle Luthi-Maire, M1. Master « Sciences de la mer », parcours « interactions biotiques et perturbations anthropiques »

Licences, licences professionnelles

Nom étudiant(e)s	Nom de la formation	Sujet du stage	Année
Marie-Elise JACQUET	Licence de Biotechnologies	Séquençage et assemblage de plasmides d'Escherichia coli : apport à la compréhension de l'évolution des β-lactamases.	2012
Khaoula FARHAT MAHMOUD	Licence Professionnelle de Biotechnologies.	Séquençage et assemblage d'un génome procaryote	2013
Camille ILLIANO	Licence de Microbiologie Industrielle et Biotechnologies	Mise en place d'un protocole d'amplification du génome d'une souche de *Thiomonas* spp	2015
Camille ILLIANO	Licence Professionnelle Microbiologie Industrielle et Biotechnologies des Cellules et des Organismes	Evaluation de l'impact du mode de conservation des échantillons sur la préparation d'ADN de haut poids moléculaire	2015
Céline Guerif	Licence Professionnelle de bio-industries et biotechnologies	Amélioration des assemblages	2016

BTS/DEUST

Nom étudiant(e)s	Nom de la formation	Sujet du stage	Année
Thomas POLIXENE	DEUST de Biotechnologies	Finition de génomes bactériens : Bactéries magnétotactiques	2009-2010
Camille ILLIANO	BTS Bio-analyses et contrôles	Pourquoi séquencer des génomes?	2014
Léah Nowominski	BTS Bio-analyses et contrôles	Etude de la dégradation de la Chlordécone par voie biologique	2015
Miranda Sylvia	BTS Biotechnologies	Adaptation dans un environnement toxique. L'influence de l'Arsenic et des biofilms sur la variabilité génomique de la bactérie *Thiomonas* sp.	2016

II. Enseignements et formations

- De 2018 à 2021 : M2 « Sciences, Technologies, Santé », parcours « Microbiologie, Environnement, Santé », module « Physiologie intégrative des microorganismes », Sorbonne Université : 8h/an
- 2018, 2021 : M2 « Sciences de la mer », parcours « Interactions biotiques et Perturbations Anthropiques en environnement marin (IPA) », Université de Toulon : 4h/an
- 2018 : M2 « Biologie-Santé », parcours « Microbiologie fondamentale », Journée du Master, Université Paris-Saclay : 2h
- De 2016 à 2018 : L3 « Science de la vie », module de Génomique, Université Evry/Paris-Saclay : 2h/an
- De 2011 à 2015 : Licence professionnelle de Biotechnologie, Université Paris-Saclay : 4h/an
- De 2009 à 2017 : M2 module de Génétique Microbienne, Universités Paris 5, 6 et 7 : 2h/an
- De 2008 à 2009 : Formations « Technologies de séquençage, assemblage et finition des génomes microbiens » : 3h/an

- De 2006 à 2007 : Formations « Annotation and analysis of prokaryotic genomes using the MicroScope platform », Univ. d'Evry-Val-d'Essonne - Durée de 4,5 jours
- 2006 : M2 Microbiologie, Institut Pasteur : 2h
- De 2002 à 2007 : Accueil et formations de collaborateurs extérieurs

III. Membre de jurys d'examens

- 2014 et 2015 : jury du BTS bio-analyses et contrôles de l'Ecole Supérieure des Techniques de Biologie Appliquée (ESTBA)

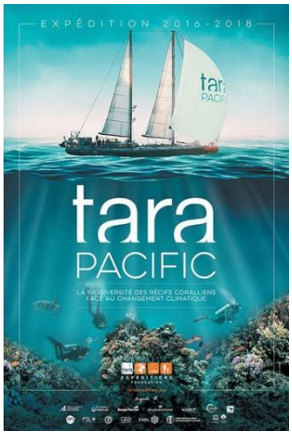
Partenariat dans des projets

I. Conduite et suivi de projets

- De 2000 à aujourd'hui : responsable de projets collaboratifs (plus de 120 projets correspondant principalement au séquençage d'un ou de plusieurs (méta)génomes procaryotes (totalisant environ 220 (méta)génomes)).
- De 2015 à 2017 : coordination des projets France Génomique. Depuis 2012, le Genoscope a intégré avec huit autres plateformes de séquençage, le réseau France Génomique (FG). Le but de cette infrastructure est de mettre à la disposition des chercheurs académiques une capacité accrue de séquençage à haut débit et de génotypage. Notre unité est dotée de fonds dédiés à des projets de grande envergure et à fort impact soumis lors d'appels à proposition. Sur ces deux années, hormis la responsabilité de la gestion des projets collaboratifs, j'ai suppléé Patrick Wincker dans la préparation du conseil scientifique pour la sélection des projets.

II. Missions

- Expédition **Tara Pacifique** : Embarquement du 5 nov au 10 déc 2016 : (Moorea (France) - Wallis (France) et du 29 jan au 5 mars 2018 : Taytay (Philippines) - Sanya (Chine)



Cette expédition s'est déroulée sur deux ans (2016 – 2018) et avait pour but d'ausculter de manière inédite la biodiversité des récifs coralliens et leur évolution face au changement climatique et aux pressions anthropiques. La goélette scientifique a parcouru plus de 100 000 km en sillonnant l'Océan Pacifique d'Est en Ouest et du Sud au Nord. Etant plongeuse, j'ai eu l'opportunité d'intégrer ce programme. Cette mission consistait en des plongées de plus de 2 heures afin de récolter des échantillons de 3 coraux (*Pocillopora meandrina*, *Millepora platyphylla* et *Porites lobata*) et de les conditionner à bord pour des analyses de métabarcode, métagénomique et métatranscriptomique en laboratoire. En revenant à terre, ma mission a été le suivi du séquençage des génomes de référence des organismes modèles de coraux

- Mission **MICMAC** : Embarquement à bord du Marion Dufresne du 15 au 30 avril 2019: Mayotte - La Réunion (France) :

L'objectif de cette campagne d'échantillonnage (qui s'est déroulée en avril 2019) était de faire un état des lieux de la pollution plastique sur les Iles Eparses. L'eau de mer, les sédiments coralliens ainsi que les macrodéchets sur les plages des îles ont été échantillonnés. Plusieurs protocoles ont été mis en place afin de couvrir une gamme de taille de déchets allant de quelques dizaines de centimètres jusqu'au nanomètre.

Bien qu'ayant été impliqués dans l'ensemble des prélèvements de cette mission, Jean-François Ghiglione et moi-même nous sommes plus particulièrement intéressés aux microplastiques (1-5 mm) issus des échantillons marins et de la laisse de mer. Le rapport final de cette mission a été rendu en juillet 2021.

- Expédition Tara **Microplastiques 2019** : Embarquement du 11 au 17 juin, du 6 au 31 juil, du 4 au 10 oct et du 3 au 22 nov : **Responsable scientifique à bord**

Cette campagne de 6 mois (de juin à novembre 2019) de la Fondation Tara Océans portait principalement sur l'identification de la pollution plastique à la source et était la première étude sur les micro- et des nano-plastiques dans le continuum terre-mer à l'échelle Européenne. Les études ont été réalisées sur 9 des plus grands fleuves d'Europe : la Tamise, l'Elbe, le Rhin, la Seine, la Loire, la Garonne, l'Ebre, le Rhône et le Tibre. Les échantillons ont été collectés dans le continuum terre-mer à l'intérieur des fleuves, au niveau des estuaires et au large.

Ce projet porté par la Fondation Tara Expéditions reposait sur la complémentarité de plusieurs partenaires institutionnels dont le LOMIC (CNRS-Sorbonne Université) auquel appartient Jean-François Ghiglione (responsable scientifique de cette expédition), le Genoscope (CEA Evry), l'IRDL (Univ. Bretagne Sud), le LEMAR (Univ. Bretagne Occidentale, CNRS, IRD, IFREMER), l'UPEC (Université Paris-Est Créteil), l'IMRCP et le LA (Univ. Toulouse), le CEFREM (Univ. Perpignan), le LOV (CNRS-Sorbonne Université) et de la société Plastic@Sea.

Ayant déjà embarqué lors de l'expédition scientifique Tara Pacifique, j'ai été en charge de l'organisation à bord et de la mise en place de tout le matériel avant le départ afin de m'assurer du bon déroulement de la mission. Durant cette expédition, j'ai été amenée à embarquer à plusieurs reprises aussi bien pour échantillonner que pour communiquer autour de la mission. J'ai par ailleurs été responsable scientifique à bord pour les prélèvements de quatre fleuves (le Rhin, la Seine, la Garonne/Gironde et la Loire) sur les six

auxquelles j'ai participé. J'ai, par ce fait, établi des rapports scientifiques de l'échantillonnage pour un grand nombre de fleuves.

III. Organisation de colloques, conférences

- Journée filière laitière, 5 juin 2018, Genoscope, Evry : **Organisatrice** et **intervenante**

Cette journée rentrait dans le cadre du projet France Génomique MetaPDOCheese retenu lors de l'appel à proposition de 2016-2017. Le but de ce projet (toujours en cours) est de mettre en évidence la nature et le rôle des moteurs biotiques dans la construction des communautés microbiennes des fromages traditionnels. Ce projet fédérateur pour les filières fromagères AOP vise à s'approprier les méthodes de séquençage haut débit de l'ADN et à générer de la connaissance sur la diversité microbienne des fromages de terroirs, en lien avec les pratiques de production. Il a été mis en place dans le cadre du réseau Fromages de Terroirs (RMT), à l'initiative de l'INRAE et en lien étroit avec les filières fromagères. Il s'inscrit dans une dynamique plus large du RMT qui vise à déployer les méthodes de métagénomique auprès des filières fromagères traditionnelles, afin de les doter d'outils permettant le pilotage des écosystèmes microbiens en vue de maintenir leur diversité.

Le but de cette journée était de maintenir une dynamique de communication/mobilisation sur le projet, en attendant les résultats. L'idée était de (i) susciter l'intérêt pour les méthodes '-omiques', (ii) favoriser l'appropriation future des résultats et (iii) créer du lien entre les partenaires du projet. Les participants étaient aussi bien des acteurs des filières fromagères (animateurs, administrateurs, opérateurs) et leurs partenaires techniques que des scientifiques impliqués dans le projet.

La journée a été rythmée par des présentations orales, des posters, des ateliers sur les applications de la métagénomique aux questions des fromages et par une visite du Genoscope. Environ 60 personnes ont assisté à ce colloque.

- European Bionano User Group Meeting (UGM), 7-8 juin 2018, Genoscope, Evry : **Organisatrice** et **intervenante**

L'entreprise Bionano Genomics (https://bionanogenomics.com) est une société qui est arrivée sur le marché de la Génomique en 2012/2013. Elle fournit des instruments qui génèrent des cartes optiques de génomes qui, à l'origine, permettaient de vérifier l'intégrité de l'assemblage *de novo* d'un génome. C'est dans ce cadre que le Genoscope s'est doté en 2013 du premier instrument de la firme (appelé Irys). Depuis, l'entreprise s'est développée avec l'instrument Saphyr et s'est plus orientée dans des applications de recherche et développement (telles que dans les maladies génétiques ou le cancer) et dans des recherches cliniques. En parallèle d'une rencontre annuelle (qui se déroulait juste avant le congrès « Plant and Animal Genomics », San Diego) de tous les utilisateurs de leurs instruments, un atelier spécialement dédié aux utilisateurs européens, et plus orienté sur des modèles plantes était organisé au printemps de chaque année. Le premier « European plant bionano user forum » eu lieu à Amsterdam en juin 2015. Dès cette rencontre, j'ai pris une part active dans ces meetings européens et j'ai proposé que le Genoscope soit organisateur du forum 2018. J'ai donc organisé cette conférence, qui s'est déroulée sur deux jours. Une cinquantaine de personnes venant de plusieurs instituts (Accela, CNRGH, INRAE, EPGV, ENS, Functional Genomics Center Zurich, Genetwister, Max Planck Institute for Evolutionary Biology, Nottingham University, Nuffield Division of Clinical Laboratory Sciences (Oxford University), Queen Mary University of London, University of Milan, Verona University, Wageningen University and Research et du Genoscope) ont répondu présent. Les membres de Bionano Genomics ont présenté les dernières avancées et les utilisateurs ont fait des retours concernant les difficultés rencontrées et les résultats obtenus.

Diffusion du travail : publications et congrès

I. Publications à comité de lecture

Depuis 1993, 178 publications avec un h-index de 74 (source Google scholar : https://scholar.google.com/citations?user=ywsREpcAAAAJ&hl=fr) ont été recensés et le nombre de citations et de publications par an de ces dix dernières années sont reportés sur la Figure 1.

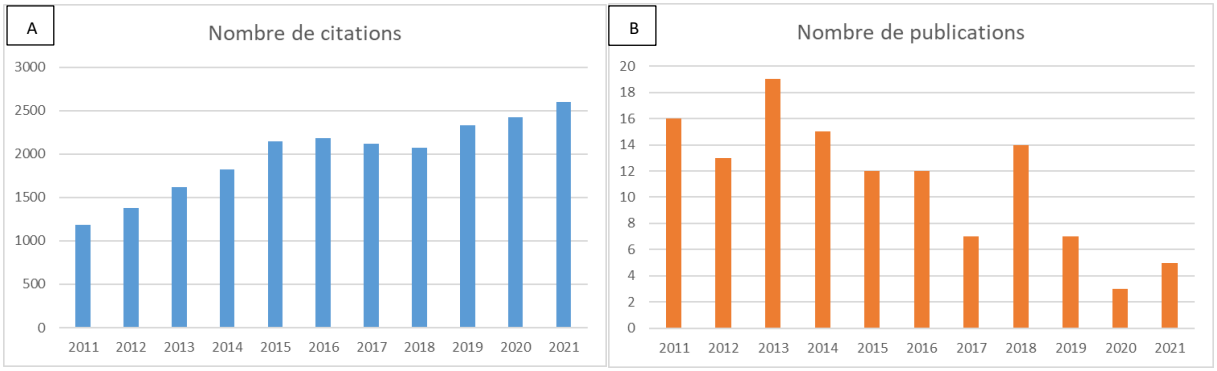


Figure 1 : Nombre de citations (A) et de publications (B) par an sur les 10 dernières années (source Google scholar).

Publications les plus significatives sur les 5 dernières années, non développées dans ce mémoire :

- Manzano-Marı N A, Coeur d'acier A, Clamens AL, Orvain C, Cruaud C, **Barbe V**, Jousselin E. Serial horizontal transfer of vitamin-biosynthetic genes enables the establishment of new nutritional symbionts in aphids' di-symbiotic systems. ISME J. 2020 Jan;14(1):259-273. doi: 10.1038/s41396-019-0533-6.

- Jacquin J, Cheng J, Odobel C, Pandin C, Conan P, Pujo-Pay M, **Barbe V**, Meistertzheim AL, Ghiglione JF. Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the "Plastisphere". Front Microbiol. 2019 Apr 25;10:865. doi: 10.3389/fmicb.2019.00865.

- Monteil CL, Vallenet D, Menguy N, Benzerara K, **Barbe V**, Fouteau S, Cruaud C, Floriani M, Viollier E, Adryanczyk G, Leonhardt N, Faivre D, Pignol D, López- García P, Weld RJ, Lefevre CT. Ectosymbiotic bacteria at the origin of magnetoreception in a marine protist. Nat Microbiol. 2019 Jul;4(7):1088-1095. doi: 10.1038/s41564-019-0432-7.

- Belser C, Istace B, Denis E, Dubarry M, Baurens FC, Falentin C, Genete M, Berrabah W, Chèvre AM, Delourme R, Deniot G, Denoeud F, Duffé P, Engelen S, Lemainque A, Manzanares-Dauleux M, Martin G, Morice J, Noel B, Vekemans X, D'Hont A, Rousseau-Gueutin M, **Barbe V**, Cruaud C,

Wincker P, Aury JM. Chromosome- scale assemblies of plant genomes using nanopore long reads and optical maps. Nat Plants. 2018 Nov;4(11):879-887. doi: 10.1038/s41477-018-0289-4.

- **International Wheat Genome Sequencing Consortium** (IWGSC); Science. 2018 Aug 17;361(6403):eaar7191. doi: 10.1126/science.aar7191.

La liste complète des publications se trouve en Annexe 1. Les références en bleues correspondent aux travaux de recherche décrits dans ce manuscrit.

II. Communications orales et posters présentés lors de conférences nationales ou internationales

- Communications orales dans des congrès internationaux :29
- Communications orales dans des congrès nationaux :16
- Posters dans des congrès nationaux et internationaux : 13

La liste des communications et des posters est présentée Annexe 2. Les références en bleues concernent celles concernant les travaux de recherche qui sont décrits dans ce manuscrit.

Communications orales à des conférences internationales (5 dernières années)

- **2018:**
  - Plant and Animal Genome XXVI Conference. "The Pisum Genus: Getting out of Pea Soup!" Jonathan Kreplak, Mohammed-Amin Madoui, Karine Labadie, Grégoire Aubert, Petr Capal, Philipp E Bayer, Petr Novak, Anthony Klein, Krishna Kishore Gali, Cyril Fournier, Léo d'Agata, Ayite Kougbeadjo, Morgane Terezol, Bunyamin Taran, Caroline Belser, Françoise Jacquin, Marianne Chabert-Martinello, Marie-Christine Le Paslier, A Bendahmane, **Valerie Barbe**, Matthieu Falque, Pavel Neumann, Jacqueline Batley, Clarice J Coyne, Tom Warkentin, David Edwards, Judith Lichtenzveig, Jiri Macas, Jaroslav Dolezel, Patrick Wincker, Judith Burstin. San Diego, USA, 13-17 janvier

- **2017:**
  - 8. International Conference on Legume Genetics and Genomics (ICLGG). "The pea genome." Jonathan Kreplak, Mohammed-Amin Madoui, Karine Labadie, Gregoire Aubert, Philippe Bayer, P Capal, Anthony Klein, Ayité Kougbeadjo, J Vrana, KK Gali, Carine Fournier, Léo d'Agata, B Taran, C Belser, Marie-Christine Le Paslier, Abdelhafid Bendahmane, Helene

Berges, V Barbe, Rebecca Mcgee, Judith Lichtenzveig, Clarice J Coyne, Tom D Warkentin, J Batley, Jiří Macas, Dave Edwards, Jaroslav Dolezel, Patrick Wincker, Judith Burstin. Siófok, Lake Balaton, Hongrie, 18-22 septembre

- Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE). "Joining the team: Co-obligate symbionts of aphids evolving from distantly related bacteria." Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Anne Laure Clamens, Céline Orvain, Corinne Cruaud, **Valérie Barbe**, Emmanuelle Jousselin. Austin, USA, 2-6 Juillet

Communications orales à des conférences nationales (5 dernières années)

- **2018**: Rencontres ALPHY/GTGC. "Ongoing Symbiont Replacement in the Aphid Cinara strobi." Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Anne Laure Clamens, Céline Orvain, Corinne Cruaud, Valérie Barbe, Emmanuelle Jousselin. Montpellier, France, 7-8 février

- **2017:** 1. International Conference on Holobionts. "The newcomers: distantly related bacteria have settled as co-obligate symbionts in aphids." Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Céline Orvain, Corinne Cruaud, **Valérie Barbe**, Emmanuelle Jousselin. Paris, France, 19-21 avril

Posters (5 dernières années)

- **2020:** Plant and Animal Genome XXVIII Conference. "Long DNA technologies evaluation for plant structural variations detection: Nanopore ONT sequencing vs Bionano Genomics optical mapping." Aurélie Canaguier, Erwan Denis, Romane Guilbaud, Ghislaine Magdelenat, Caroline Belser, Benjamin Istace, Cruaud Corinne, Arnaud Lemainque, Patrick Wincker, Marie-Christine Le Paslier, Patricia Faivre-Rampant, **Valérie Barbe**. San Diego, USA, 11-15 janvier

- **2019** : . Jinguang Cheng, Justine Jacquin, Caroline Pandin, Charlène Odobel, Philippe Catala, David Pecqueur, Christophe Salmeron, Mireille Pujo-Pay, Pascal Conan, Boris Eyheraguibel, Anne-Marie Delort, **Valérie Barbe**, J Hoypierres, G Deligey, Stéphane Bruzaud, Pascale Fabre, Matthieu George, Jean-François Ghiglione, Anne-Leila Meistertzheim. « Dégradation des plastiques par les bactéries marines ». Premières Rencontres du GDR Polymères et Océans, Créteil, France, 24-26 juin

- **2018:**
  - 2. Joint Congress on Evolutionary Biology. "Coming and ceasing to be: Evolution of recent mutualistic associations in aphid endosymbionts." Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Anne Laure Clamens, Céline Orvain, Corinne Cruaud, **Valérie Barbe**, Emmanuelle Jousselin. Montpellier, France, 18-22 août

  - 50. anniversary of the neutral theory of molecular evolution; Annual Meeting of the SMBE."The coming and going of mutualistic symbionts: The ins and outs of co-obligate

endosymbiont replacement in Cinara aphids." Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Anne Laure Clamens, Céline Orvain, Corinne Cruaud, **Valérie Barbe**, Emmanuelle Jousselin. Yokohama, Japon, 8-12 juillet

- Plant and Animal Genome XXVI Conference. "Optical Mapping with the Saphyr System on Plant Genomes." Erwan Denis, Caroline Belser, Wahiba Berrabah, Ghislaine Magdelenat, Corinne Cruaud, Arnaud Lemainque, Jean Marc Aury, **Valerie Barbe. San Diego, USA, 13-17 janvier**

- Plant and Animal Genome XXVI Conference. "Optimized Methods for High Molecular Weight Genomic DNA Isolation." Erwan Denis, Sophie Sanchez, Ghislaine Magdelenat, Corinne Cruaud, Arnaud Lemainque, Jean-Marc Aury, **Valerie Barbe. San Diego, USA, 13-17 janvier**

- **2017:** JOBIM. "Ultra High throughput, single molecule mapping of replicating DNA." Nikita Menezes Braganca, Francesco de carli, Wahiba Berrabah, **Valérie Barbe**, Auguste Genovesio, Olivier Hyrien. Lille, 3-6 juillet

III. Demande de financements

Les projets de collaborations bénéficient, via les appels à projet, des subventions que le Genoscope reçoit pour la réalisation de travaux de grande envergure ayant un impact sociétal. Néanmoins, pour permettre de compléter une étude certaines demandes de financement ont été déposées lors d'autres appels à projet. Ce fut le cas pour les projets Thiofilm et Adamos dont les projets ont été soumis respectivement à l'ANR et à CASDAR.

Le projet Thiofilm permettait d'étudier le rôle des biofilms dans l'adaptation et la variabilité génomique des bactéries du genre Thiomonas, impliqués dans les processus de remédiation naturelle dans les drainages miniers. Les micro-organismes jouent un rôle crucial dans la biosphère, car ils sont impliqués dans les cycles biogéochimiques des éléments nutritifs y compris le recyclage des substances présentes dans les déchets. Ces micro-organismes sont par ailleurs des outils biotechnologiques largement utilisés dans diverses industries, et plus récemment dans les procédés de biorémédiation. L'état physiologique de ces organismes, et par conséquent leurs capacités métaboliques, dépendent de nombreux facteurs qui peuvent influencer l'efficacité d'un procédé ou la stabilité d'un écosystème. Aussi, l'analyse de la diversité fonctionnelle au sein d'une communauté et la compréhension des mécanismes d'adaptation d'une communauté aux contraintes environnementales représentent des objectifs majeurs actuellement en écologie microbienne. Un budget de ~350K€ a été alloué pour la réalisation de ce projet.

Cette diversité était aussi au cœur du projet Adamos (en lien avec le projet PetaPDOCheeses, précédemment cité) qui avait pour but d'avoir un nouveau regard sur les écosystèmes laitiers et fromagers : adaptation, développement et appropriations des méthodes omiques à des fins d'écologie microbienne. La gestion des écosystèmes microbiens laitiers et fromagers participe largement à la typicité des fromages. Avec le développement des outils d'analyse haut débit, les « omiques » fournissent l'opportunité de décrire l'activité et le rôle des différents micro-organismes et ce à chaque étape de la fabrication. Ce projet de recherche et développement ayant un volet de transfert des technologies aux filières fromagères a obtenu une subvention de 500 K€ pour ce projet.

Communiqués de presse, vulgarisation et responsabilité collective

I. Communiqués de presse :

L'ensemble des articles de presse et des interviews est présenté en Annexe 3. Ces communications proviennent essentiellement de la mission Tara Microplastiques 2019.

II. Vulgarisation scientifique

Conférences/Journées de sensibilisation

- **2022**
  - Colloque de collioure - Méditerranée - Climat et risques environnementaux : Prévu le 24 juin, Port-Vendres
  - Midi Minatec : 1er Avril, en visioconférence
- **2021 :**
  - Conférence Université du Temps Libre (UTL) Evry : 16 dec, en visioconférence
  - TARA education - échanges entre des chercheur.se.s et des scolaires : 3 mars, 23 nov, 7 dec, en visioconférence
  - Colloque de Collioure - Méditerranée Climat et risques environnementaux : 25-28 Aout (Invité mais annulé pour cause de Covid)
- **2020 :**
  - Conférence pour Sciences Po Environnement, dans le cadre de la semaine européenne de la réduction des déchets, dans le but de sensibiliser les élèves de Sciences Po : 23 nov, en vioconférence
  - Débat Public - Le Problème du Plastique dans nos Océans et Nos Vies. Organisé par Les SeaSters Francaises d'eXXpedition et la Fondation Tara Océan : 12 oct, en visioconférence
  - Conférence CEA dans le cadre de la fête de la science : Oct, https://youtu.be/5f4jhq8bfEY
- **2019 :**
  - Journée de sensibilisation sur la pollution plastique à l'Etang de Berre, 17 oct
  - Journée de sensibilisation sur la pollution plastique à Marseille, 27 sept

Article

L'article publié dans la revue Subaqua de la Fédération Française d'études et de sports sous-marins (FFESSM) en Juillet-Aout 2018 (p.24-26) faisait suite à un article scientifique publié relatant l'état des récifs corallien de l'île Upolu (état indépendant des îles Samoa) (Ziegler *et al.*, 2018).

Retombées médiatiques :

- **24 mars 2018** : Radio RFI ; L'expédition Tara face à la tragédie de la pollution de l'océan Pacifique. http://www.rfi.fr/emission/20180324-2-tara-expedition-coraux-pollution-plastique-ocean-pacifique-mer-chine
- **2 avril 2018** : TV Chaîne France Ô ; Tara, l'odyssée du corail. 50 minutes. https://www.france.tv/documentaires/animaux-nature/159345-tara-l-odyssee-du-corail.html
- **26 avril 2018** : Communiqués de presse du CNRS ; Changement climatique et pratiques locales : double peine pour un récif corallien : http://www2.cnrs.fr/presse/communique/5575.htm
- **30 avril 2018** : L'Humanité ; Les coraux d'Upolu ne refleuriront plus https://www.humanite.fr/biodiversite-les-coraux-dupolu-ne-refleuriront-plus-654560
- **2 mai 2018** : Bateaux Magazine ; Conditions climatiques et activités humaines : de fortes menaces pour les coraux : https://www.bateaux.com/article/28219/conditions-climatiques-activites-humaines-de-fortes-menaces-coraux
- **2 mai 2018** : Sciences et Avenir ; La double peine des récifs coralliens les plus isolés de l'Océan Pacifique https://www.sciencesetavenir.fr/nature-environnement/climat/la-double-peine-des-recifs-coralliens-les-plus-isoles-de-l-ocean-pacifique_123530
- **2 mai 2018** : Le Marin ; Un récif corallien isolé des Samoa a presque disparu en deux ans http://www.lemarin.fr/secteurs-activites/environnement/31327-un-recif-corallien-isole-des-samoa-presque-disparu-en-deux
- **3 mai 2018** : Radio Classique 3 minutes pour la planète ; Le blanchissement massif des coraux du Pacifique. https://www.radioclassique.fr/radio/emissions/matinale-de-radio-classique/3-minutes-planete/
- **7 mai 2018** : Le Figaro ; Quand activités humaines et climat se conjuguent pour massacrer les coraux : http://www.lefigaro.fr/sciences/2018/05/07/01008-20180507ARTFIG00201-quand-activites-humaines-et-climat-se-conjuguent-pour-massacrer-les-coraux.php
- **11 mai 2018**: National Geographic; Even remote coral reefs aren't spared from devastation: https://news.nationalgeographic.com/2018/05/samoan-islands-upolu-coral-reef-bleaching-climate-change-science-spd/

III. Participation à la mise en place de réseaux scientifiques

La communauté PLASTnet (PlasticNetwork) est un réseau, créer en décembre 2019, qui regroupe à l'heure actuelle plus de 130 membres rattachés à plusieurs départements du CEA (Département de la Recherche Fondamentale (DRF), Département de la Recherche Technologique (DRT) et Département des Energies (DES)). Le but de cette communauté est de créer une transversalité entre la biologie, la (bio)chimie

et la (bio)physique au service de la fonctionnalisation, du piégeage, de l'extraction et la dépolymérisation des plastiques et particules de plastiques, avec des applications environnementales et industrielles. Une vue générale de la communauté, replacée dans le contexte d'une économie circulaire du plastique est présentée Figure 2.

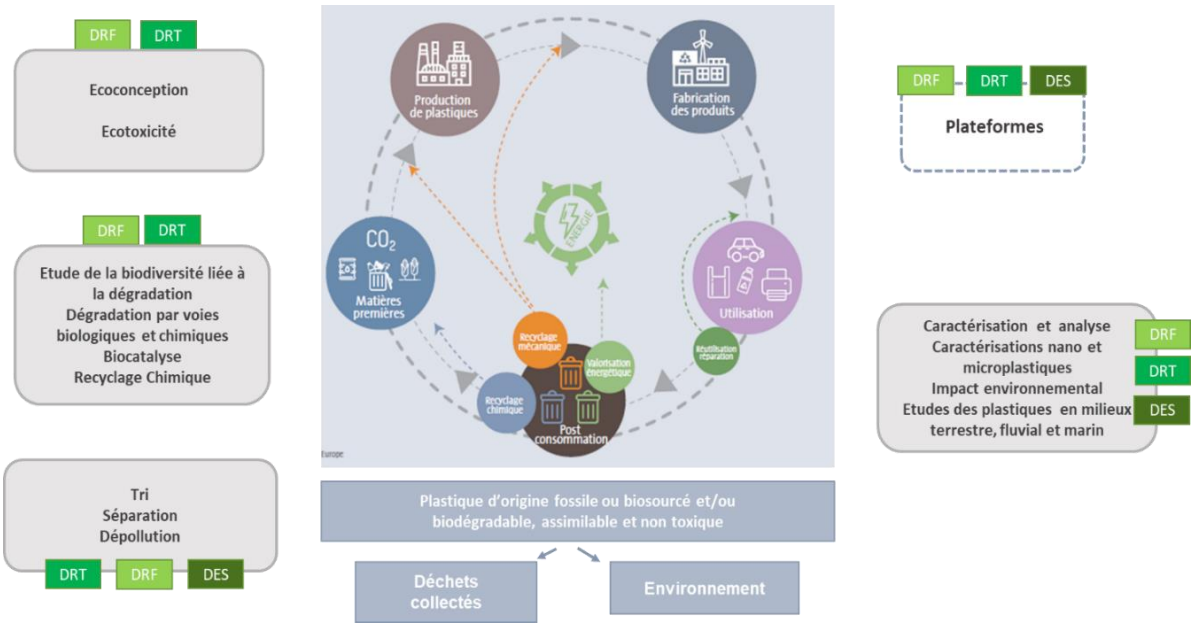


Figure 2 : Vue des axes de recherches de la communauté du réseau PLASTnet dans le cadre de l'économie circulaire du plastique. Le comité d'organisation est composé de : Virginie Chapon (DRF/BIAM), Muriel Marchand (DRT/DTCH), Sylvain Nizou (DES), Isabelle Philippe (DRF/ISVFJ), Nathalie Picollet-d'Hahan (DRF/IRIG), Jean-Philippe Renault (DRF/IRAMIS), Sébastien Rolere (DRT/DTNM), Jean-François Sassi (DRT) et Valérie Barbe (DRF/IFJ).

Fort de sa multidisciplinarité, PLASTnet est dotée aujourd'hui d'un comité d'animation, auquel je participe, constitué d'un représentant de chaque institut de la DRF et de la DRT et DES. Faisant partie du comité d'organisation depuis la première heure de ce réseau, j'ai une part très active dans l'animation de PLASTnet. Malgré la situation sanitaire, nous avons organisé trois journées journées « synergies » sur la fin de vie des plastiques, le recyclage et l'éco-conception durant lesquelles j'ai suggéré des intervenants (académiques et industriels) et été l'animatrice. Par ailleurs, pour garder une dynamique d'échange de la communauté, j'ai proposé d'organiser des rendez-vous mensuels (« café PLASTnet »), qui se déroulent tous les premiers mardis du mois, permettant de présenter les activités de recherche entre autres du CEA, et d'échanger avec des industriels/chercheurs académiques sur des thématiques telles que le tri/recyclage, la dépolymérisation, l'écoconception, la toxicité…. Le comité d'organisation se fait aussi le relai pour informer la communauté concernant des congrès, articles scientifiques et de presse, rapports d'expertises…Pour ce faire, je relie les informations qui me sont transmises et je fais de la vieille d'informations quotidiennement.

Activités de recherche

I. Introduction

Mon immersion dans la génomique a commencé lors d'un stage effectué dans le laboratoire de génétique moléculaire (Bat 400, Université Paris XI (désormais Paris-Saclay)) dirigé par Monique Bolotin-Fukuhara. Ce laboratoire travaillait sur les levures et était fortement impliqué dans un programme international concernant le séquençage du Chr XI de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La méthodologie de séquençage utilisée à l'époque était celle dite « de Sanger » en utilisant de la radioactivité (^{35}S) (Sanger *et al.*, 1997). Mon stage s'est prolongé par des vacations pour finir ce programme et travailler sur le projet six packs EUROFAN (EUROpean Functional Analysis Network), concernant la délétion systématique de tous les gènes du ChrXI de *S. cerevisiae* afin d'identifier un phénotype associé. L'expérience acquise m'a permis de postuler sur un poste d'ingénieur lors de la création du Genoscope.

Mes compétences en génomique ont évolué avec ma carrière au Genoscope. Lors du séquençage *de novo* d'organismes de référence, il est évidemment crucial d'avoir une continuité de génome, sans erreur ni d'organisation ni de séquence. La finition d'un génome consiste à organiser, valider et compléter les fragments du génome obtenus après assemblage des lectures issues du séquençage aléatoire (appelé « shot gun »). L'intérêt de l'étape de finition est d'obtenir une séquence complète de haute qualité du génome. En effet, lorsque l'on souhaite faire une analyse fine d'un génome, que cela soit au niveau de sa composition génique ou de son organisation globale, il est important d'obtenir la meilleure qualité possible. Par exemple, l'identification de la présence/absence de gènes d'intérêt, l'analyse fonctionnelle et la génomique comparative nécessitent préférentiellement une séquence complète finie. De la même manière, la plasticité d'un génome ne peut être étudiée que si l'ensemble du génome est connu et sa séquence fiable. Malheureusement, cette exigence a un prix : la finition peut être longue, fastidieuse et parfois (très) couteuse. C'est pour cela qu'elle ne concernait que les génomes procaryotes et de levures. Ce savoir-faire en finition m'a permis de mieux connaître les génomes bactériens et a été un plus lors de ma thèse, axée sur l'analyse comparative de génomes d'Acinetobacter, menée en parallèle de la gestion du laboratoire. L'arrivée des nouvelles technologies de séquençage (NTS) vers 2004 a révolutionné la génomique.

Frederick Sanger et ses collègues avaient publié en 1977 (Sanger *et al.*, 1997) une méthode de séquençage de référence et jusqu'en 2006, toutes les évolutions dans le domaine du séquençage étaient basées sur cette technologie. Le séquençage d'un génome *de novo* par la « méthode de Sanger » nécessitait la préparation de plusieurs banques de clones avec des tailles variables de fragments d'ADN. Ces banques de clones étaient utilisées lors de la finition du génome pour orienter les portions de séquences obtenues

après assemblage des lectures « shot gun » et servaient de matrice pour faire du séquençage ciblé afin de valider et compléter certaines régions de ce génome. Or ce qui a révolutionné le domaine du séquençage est l'arrivée du séquençage haut débit développé par deux sociétés, Roche-454 dans un premier temps (Margulies *et al.*, 2005, https://www.roche-applied-science.com/sis/sequencing/genome/system.jsp) et Illumina (https://www.illumina.com) (connu sous le nom de Solexa à l'époque), basé sur de l'amplification de fragments d'ADN mais sans passer par cette étape de clonage. Ces nouvelles technologies de séquençage (NTS) produisaient à leur arrivée des longueurs de lectures comprises entre 25nt et 100nt (comparé à celles obtenues par la méthode de Sanger qui étaient en moyenne aux alentours de 650nt). Associé à cela, le taux d'erreurs des lectures était bien supérieur avec la technologie proposée par Roche. En quelques années, les NTS ont permis l'augmentation du nombre de séquences produites au moins d'un facteur 1000 (qui a atteint plus de 10^7 en 2016 et qui ne cesse d'augmenter) (Nederbragt, 2016), tout en diminuant drastiquement le prix de la base (d'un facteur 10 à 100 à l'époque, et en 15 ans d'un facteur 100000) (National Human Genome Research institut (NIH), https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost, Figure 3).

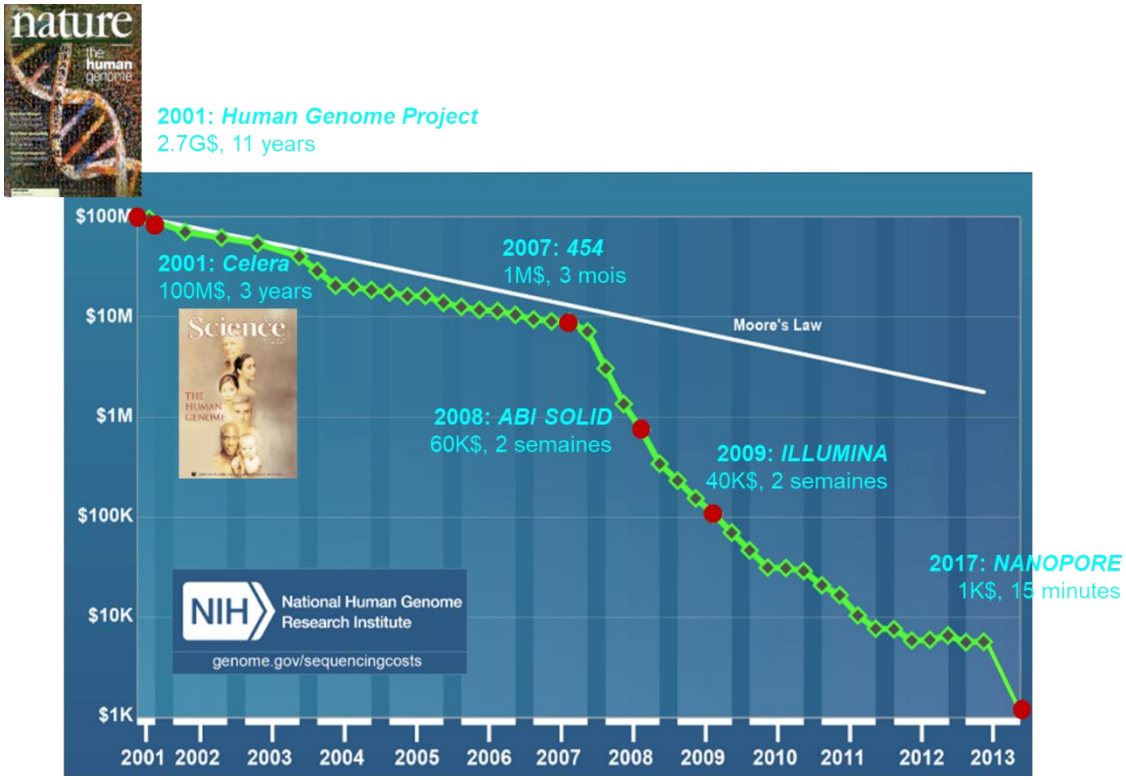


Figure 3 : Evolution du séquençage en 15 ans, en termes de production de séquences et du coût de la base (ressource NIH).

Mais la contrepartie a été que la taille des séquences produites et leur taux d'erreurs ont augmenté non seulement la difficulté de l'assemblage de ces lectures, mais surtout démultipliaient la quantité de travail de la phase de finition. Comme tous les outils de bio-informatiques utilisés pour le traitement des lectures n'étaient plus du tout adaptés aux nouveaux formats de données et que toutes nos stratégies de « finition » utilisaient les banques de clones, il a donc fallu être inventif pour gérer ces assemblages de génomes mais surtout, pour réussir à maintenir un niveau de qualité comparable à celui obtenu avec des données obtenues uniquement en méthode Sanger. J'ai donc développé de nouvelles stratégies de finition par la mise en place de nouvelles expérimentations et l'utilisation de nouveaux outils informatiques parfois basés sur la conservation du contexte génomique entre deux espèces proches, ce qui nous permettait d'avoir des pistes pour l'organisation des fragments de génomes. Bien entendu, ces pistes étaient validées systématiquement de manière expérimentale. Sur quelques années, ces nouveaux séquenceurs ont offert une capacité de débit de plus en plus importante engendrant une chute du prix de la base séquencée et rendant du coup la finition d'un génome plus couteuse que le séquençage aléatoire. Par conséquence, le nombre de génomes microbiens à finir chuta drastiquement. C'est à ce moment-là que les compétences du Laboratoire ont été utilisées pour expertiser et améliorer l'assemblage de génomes de tailles plus grandes et plus complexes. En effet, les NTS permettaient enfin d'aborder du séquençage « shot gun » des grands génomes mais la complexité de ces derniers en termes de séquences répétées, taux d'hétérozygotie… liés à la longueur des lectures toujours trop courtes (~150nt) conduisaient à des résultats d'assemblage comportant souvent des problèmes d'organisation. Nous avons donc utilisé notre expérience pour analyser certains assemblages de grands génomes comme celui du blé tendre *Triticum aestivum*, en se focalisant dans un premier temps sur le Chr 3B.

Triticum aestivum est l'espèce du blé tendre, céréale essentielle pour la nutrition humaine et principalement utilisée pour la confection des semoules et des pâtes. C'est une espèce hexaploïde (6n = 42) au génome de type AABBDD, et de taille frolant les 17 Gb avec près de 90% de séquence répétées. Le Chr 3B (estimé à 1Mb) avait été séquencé par le Genoscope en 454 à partir de pools de BACs chevauchants et organisés. Dû à la très haute fréquence de séquences répétées présentes dans ce génome, les logiciels d'assemblage ne permettaient pas de le séquencer directement en « shot gun ». Après avoir analysé l'ensemble des données que j'avais à disposition, j'ai proposé une stratégie semi-automatique pour améliorer les résultats d'assemblage du chromosome 3B du blé, mais nécessitant une validation experte, ce qui a permis d'atteindre un très bon niveau de qualité de ce chromosome servant de référence pour le séquençage des autres chromosomes (Choulet *et al.*, 2014). Suite à cela, j'ai proposé une stratégie de séquençage pour les autres chromosomes afin d'obtenir des résultats d'assemblage comparables à ceux obtenus pour le chromosome 3B, mais sans intervention humaine. Cette stratégie fut présentée à l'ensemble du consortium IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium) et adoptée pour le séquençage du Chr 1B, réalisé au Genoscope. Les résultats que nous avons obtenus après séquençage et

assemblage du 1B étaient comparables voire meilleurs que ceux publiés pour le chromosome 3B (IWGSC, 2014).

Toujours dans le cadre de l'amélioration des génomes, je me suis intéressée aux systèmes de cartes optiques dont le premier appareil est apparu vers 2012. Le Laboratoire s'est doté successivement des trois systèmes mis sur le marché (Argus® (OpGen), Irys™ puis Saphyr™ (BioNano Genomics)) permettant la réalisation de cartes optiques d'un génome de manière semi-automatique. Le Genoscope a été le premier centre en France à acquérir ces instruments.

Lors de l'expédition Tara Pacifique pendant laquelle j'ai participé à deux transects de six semaines, j'ai rencontré Jean-François Ghiglione du Laboratoire d'Océanographie Microbienne (LOMIC-UMR7621), qui est un expert en écotoxicologie microbienne notamment concernant la pollution plastique en milieu marin. Ma sensibilité personnelle pour le monde marin et mon souhait de plus axer ma carrière sur des recherches environnementales, ont été les déclencheurs de ma réorientation professionnelle. Pour cela, j'ai demandé une mission de collaboration avec Jean-François Ghiglione, pour travailler sur la pollution des plastiques en milieu marin et notamment sur l'analyse de la plastisphère (microorganismes colonisant les fragments de plastiques) et la biodégradation des plastiques. Cette demande de mission avait du sens puisque le LOMIC et le CEA/Genoscope collaboraient déjà depuis plusieurs années dans le cadre des expéditions Tara, avaient co-signé plusieurs articles et faisaient partie de la nouvelle Fédération de Recherche Tara créée en 2018 (FR2022). Les expertises complémentaires des deux unités permettaient d'aborder cette problématique avec plus d'envergure : le LOMIC, reconnu internationalement pour ses travaux sur la colonisation et la biodégradation des plastiques, ainsi que leur toxicité en milieu marin apportait ses compétences dans les domaines de l'éco(toxico)logie microbienne marine et le Genoscope apportait ses compétences dans la caractérisation à l'échelle génomique d'organismes importants pour l'environnement ainsi que dans l'analyse fonctionnelle de la biodiversité y compris pour des applications en bioremédiation.

Dans ce mémoire, j'ai pris le parti de me focaliser principalement sur le travail que j'ai réalisé ces quatres dernières années. Tout d'abord, je vais vous présenter une étude qui a été initiée quelques mois avant ma demande de collaboration portant sur la comparaison de deux technologies (séquençage à longues lectures et cartographie optique) pour la détection de variations structurales chez les plantes. Cette étude, je l'ai initiée, suivie et menée jusqu'à sa valorisation. Dans un deuxième temps, je vous présenterai les projets que je mène avec le LOMIC, d'une part sur de la plastisphère puis dans un second temps sur des polymères de type polyhydroxyalcanoates (PHA), qui présentent un intérêt grandissant dans le secteur des plastiques biosourcés, biodégradables et non toxiques pour l'environnement. Ces travaux, qui rentrent dans le cadre de la pollution plastique en milieu marin, sont la génèse de ceux que je compte poursuivre dans les années futures. De ce fait, pour finir, je vous présenterai le projet de recherche que je souhaite mener dans les années à venir. N'ayant pas un vrai fil rouge pour l'ensemble de ces recherches, une mise en contexte sera développée afin d'introduire chaque chapitre.

II. Comparaison de technologies pour la détection de variations structurales chez les plantes

1. Technologie Oxford nanopore (ONT)

Comme mentionné précédemment, l'arrivée des NTS a révolutionné le séquençage. A l'heure actuelle, le leader mondial de ces secondes générations de séquençage est Illumina qui a permis une évolution rapide de sa technologie, en termes de longueur de lectures, de débit et du coût de la base (Figure 3). Cependant, les génomes étant souvent composés de séquences répétées, seules des lectures de taille suffisante peuvent couvrir ces régions et permettre un meilleur assemblage. On les appelle des technologies à longues lectures et représentent la troisième génération de séquençage. Le premier instrument à avoir été commercialisé a été le PacBio RSII (Pacific Bioscience, https://www.pacb.com/,). La technologie permet de faire du séquençage en temps réel d'une molécule d'ADN (Figure 4 (A) et (B)) et les longueurs de lectures peuvent faire plusieurs dizaines de kilobases (Rhoads et Au, 2015). Cependant, le premier instrument avait de telles caractéristiques en termes de volume (200.4 cm x 77.0 cm x 158.0 cm) et de poids (1 tonne) (https://www.mscience.com.au/upload/pages/pacbio/pacbio_rs_ii_brochure.pdf), que peu de laboratoires ont pu s'en doté (Figure 4 (C)).

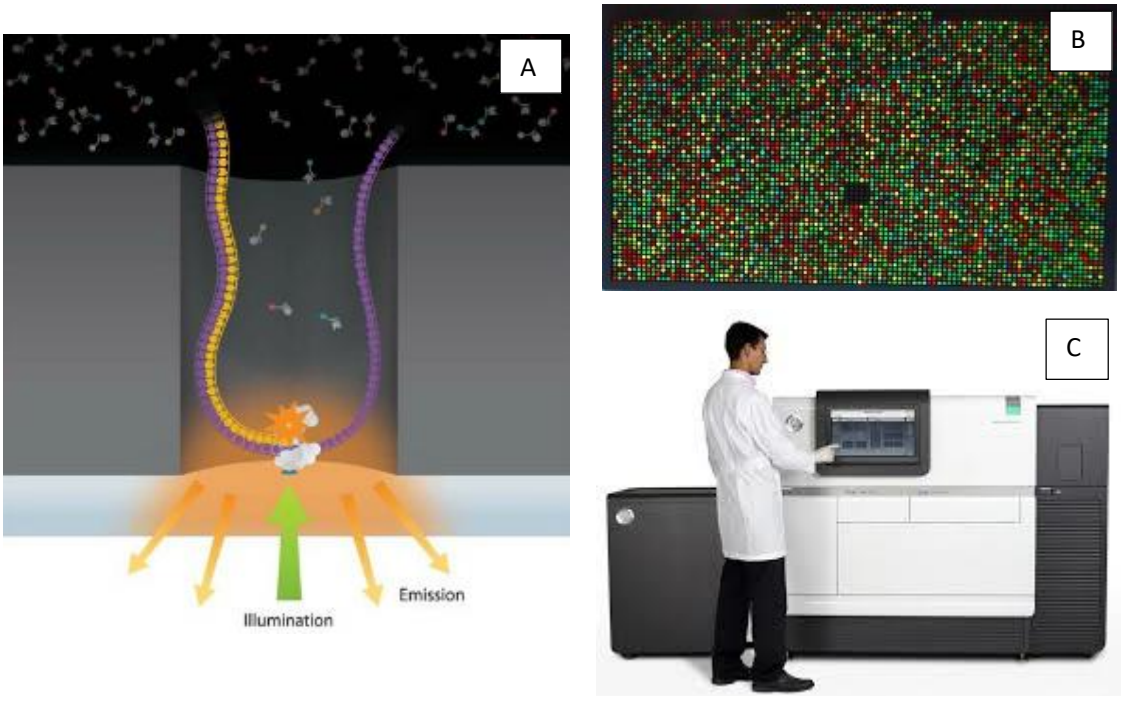


Figure 4: Methodologie Pacific Bioscience. (A) Une ADN polymérase est fixée au fond d'un nano-puit (~70nm). (B) A chaque incorporation d'un nucléotide marqué (les 4 bases ont un marquage différent), il y a une illumination par le fond du puit pour la détection du dNTP incorporé. (C) Séquenceur PacBio RSII.

L'arrivée du Minion (technologie Oxford Nanopore, https://nanoporetech.com/, Lu *et al.*, 2016) a été une révolution concernant la miniaturisation. Légèrement plus grand qu'une clé USB (Figure 5 (A)), ce séquenceur portatif peu se brancher directement sur n'importe quel ordinateur et, à titre d'exemple, a permi lors de l'épidémie d'Ebola en 2016 d'identifier directement sur le terrain les patients contaminés (Hoenen et al., 2016). Cette technologie est basée sur une différence de potentiel créée lors du passage de la molécule d'ADN dans un pore protéique (Figure 5 (B)). Tout comme pour la technologie PacBio, ONT peut générer des lectures de plusieurs kilobases.

Figure 5 : Technologie Oxford Nanopore Technology (ONT). (A) Séquenceur Minion. (B) Pore protéïque laissant passer la molécule d'ADN. Le signal de différence de potentiel mesuré correspond au passage de 5 bases dans le pore

Bien que l'arrivée de cette 3ième génération de séquenceurs ait été un vrai saut technologique, ces deux méthodologies ont une faille qui réside en un taux d'erreur assez élevé (de l'ordre de 8 à 15%), à l'exception de la dernière chimie développée par PacBio, HiFi (High Fidelity) qui permet d'avoir un taux de précision de l'ordre de 99,8% (Lal *et al.*, 2021). Les longueurs de lectures générées par ces technologies permettent non seulement d'améliorer considérablement les assemblages *de novo* des génomes, de reconstruire des génomes à partir de séquences de métagénomes, avoir des transcrits complets pour de l'annotation et de l'analyse d'expression différentielle, mais aussi d'investiguer de la génomique comparative avec la recherche, par exemple, de détection de bases modifiées ou de variations structurales (Amarasinghe *et al.*, 2020).

2. Cartographie optique

Une carte optique d'un génome correspond au profil enzymatique de ce génome. Les molécules d'ADN génomique sont digérées ou taguées à l'aide d'une enzyme et les profils de toutes les molécules sont compilés afin de reconstruire la carte de restriction globale du génome appelée « Whole Genome Map ».

La génération de cartes optiques permet de valider/invalider l'assemblage de génomes. Le principe des systèmes Argus (commercialisé par Opgen) et Irys (développé par Bionano Genomics) est présenté dans la Figure 6 ci-dessous.

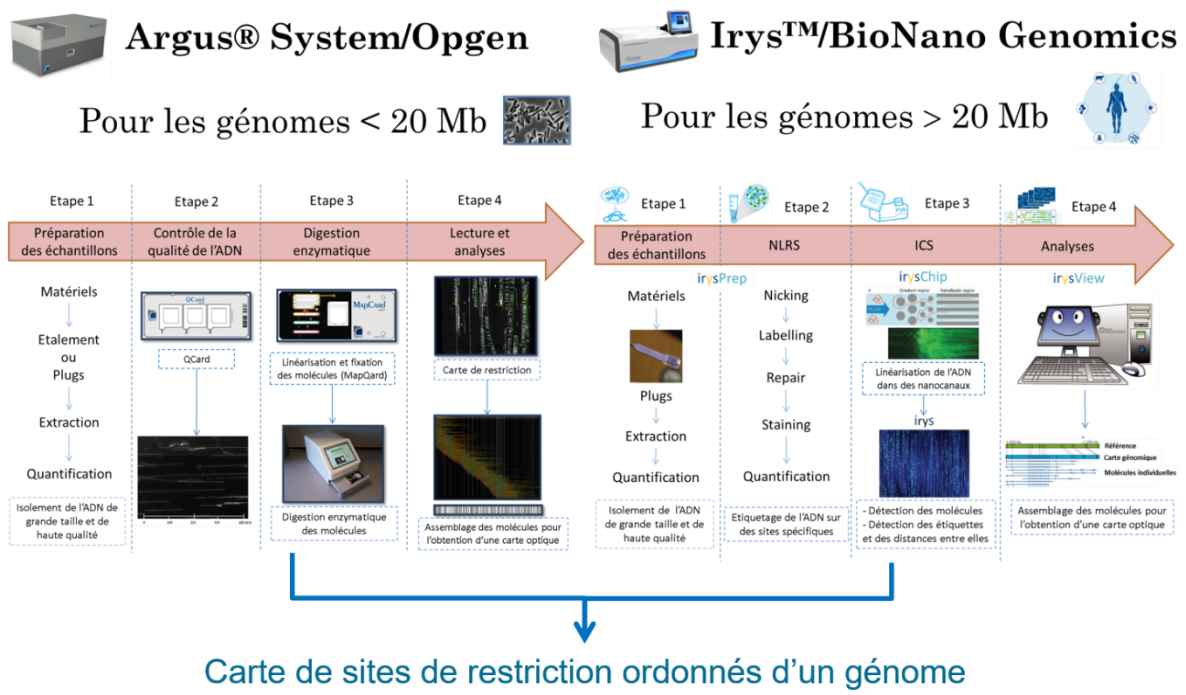


Figure 6 : Comparaison de deux systèmes de cartographie optique : le système Argus et Irys.

Les différences entre les deux systèmes reposaient sur le mode de détection des sites et de l'analyse des données. Dans le cadre de la méthodologie Opgen, les molécules étaient fixées sur une lame de verre et la digestion se faisait directement sur la surface. Les sites étaient repérés grâce à une rupture de tension de l'ADN et l'analyse se faisait par scan de la lame de verre. La technologie NRLS (Nicking, Labeling, Repair, Staining) de Bionano Genomics repose sur un marquage des sites de restriction, suivi d'une migration des molécules dans des nanocanaux permettant l'analyse de la fluorescence correspondant aux sites de restriction. Le système Saphyr™ est une évolution de l'Irys™ grâce au mode du marquage de l'ADN (marquage direct du site de restriction, direct label and stain (DLS) labeling : l'enzyme utilisée (DLE-1) ne coupe plus les sites de restriction mais les marque directement après reconnaissance d'un motif de 6 bases) et au logiciel permettant d'analyser une plus grande quantité de données (400 Gb au lieu de 100 Gb).

Dans le laboratoire, ces instruments ont essentiellement été utilisés pour l'amélioration et la validation d'assemblages des génomes, ainsi que pour de la comparaison de structure de génomes tels que de *Enterococcus faecalis* (Gonzalez-Zorn *et al.*, non publié). Néanmoins, j'ai utilisé le dernier instrument de Bionano Genomics (Saphyr™) pour faire une étude comparative entre cette technologie et la technologie de séquençage Oxford Nanopore dans la mise en évidence de variations structurales chez *Arabidopsis thaliana*.

3. Variations structurales

Les variations structurales (SV) sont définies comme des évènements génomiques, allant de 50 pb à plusieurs mégabases, qui diffèrent entre des individus et qui conduisent à des changements phénotypiques au sein d'une espèce en ayant un impact sur l'expression des gènes et la fonction des protéines plus importantes que celui engendré par des polymorphismes liés à une seule variation de nucléotides (SNP, single nucleotide polymorphisms, (Chiang *et al*., 2017)). De ce fait, les SVs participent au processus de sélection naturelle et d'évolution biologique. Il existe plusieurs types de SVs, qui sont soit des réarrangements déséquilibrés sous forme de variations du nombre de copies (CNV), y compris des insertions/suppressions (Indels) et des variations de présence/absence (PAV), soit des événements équilibrés sous forme d'inversions et de translocations (Escaramis *et al.*,2015).

Bien que ce type d'évènements ait été mis en évidence pour la première fois par Bridges, en 1936 (Bridges, 1936), il aura fallu attendre le début du XXI sciècle pour connaître l'importance de ce polymorphisme chromosomique chez l'homme (Iafrate *et al.*, 2004 ; Sebat *et al.*, 2004). Les variations structurales sont désormais largement étudiées et leurs impacts sur des maladies humaines n'est plus à démontrer (revue Ho *et al*., 2020). Chez les plantes, la capacité d'adaptation dépend de cette aptitude à enrichir leur patrimoine génétique. Ces modifications du génome peuvent être à l'origine d'adaptations locales (Prunier *et al.*, 2017 ; Prunier *et al.*, 2019) ou de traits d'intérêt économique (Wang *et al.*, 2015 ; Gong *et al.*, 2018 ; Gao *et al.*, 2019). Néanmoins, ces évènements sont rares et leur impact à court terme reste difficile à évaluer. La large taille, la présence d'un grand nombre d'élèments transposables (IWGSC, 2014 ; Choulet *et al.*, 2014) ainsi que la polyploidie retrouvée dans plus de 80% des espèces de plantes (Meyers et Levin, 2006), sont des facteurs de la complexité de leurs génomes rendant l'identification des SVs un vrai défi.

Les premières observations des variations structurales étaient faites par microscopie avec une résolution > 3Mb (Feuk, Carson et Scherer, 2006) (Figure 7 (A)). Ce n'est qu'avec l'apparition des marqueurs génétiques et du séquençage que les études globales des variations structurales chez les plantes ont vu le jour (CGH (Comparative Genomic Hybridation, Figure 7 (B)) ou puces SNP (Figure 7 (C)) (Springer *et al.*, 2009 ; Swanson-Wagner *et al.*, 2010 pour le maïs ; Hwang *et al.*, 2016 pour le riz). Leur nombre a considérablement augmenté avec le développement des nouvelles technologies de séquençage permettant l'identification de nombreux SVs de petites tailles chez plusieurs espèces (Gimode *et al.*, 2016 ; Lyons *et al.*, 2011 ; Brenchley *et al.*, 2012 ; Xing *et al.*, 2016 ; Maldonado dos Santos *et al.*, 2016 ; The 1001 Genomes Consortium *et al.*, 2016 ; Pucker *et al.*, 2016 ; Pinosio *et al.*, 2016) (Figure 7 (D)). En revanche, ces technologies ont montré leurs limites pour la détection de grandes variations liées à la longueur des lectures (de quelques centaines de nucléotides). Par ailleurs, la détection de SVs dans des régions hautement répétitives n'était ni précise, ni fiable. L'évolution des technologies de séquençage vers la 3^{e} génération a offert des opportunités pour identifier de nouveaux SVs (Redmond *et al.*, 2020 ; Rhoads *et al.*, 2015 ; Lu *et*

al., 2016). Ces technologies permettent en effet d'avoir une cartographie des variations à plus large échelle et parfois de régions complexes. En parallèle de cette dernière génération de séquençage, est apparue la technologie Bionano Genomics qui, comme déjà mentionné, ne donne pas accès à la séquence mais à une cartographie physique d'un génome (Figure 7 (D)).

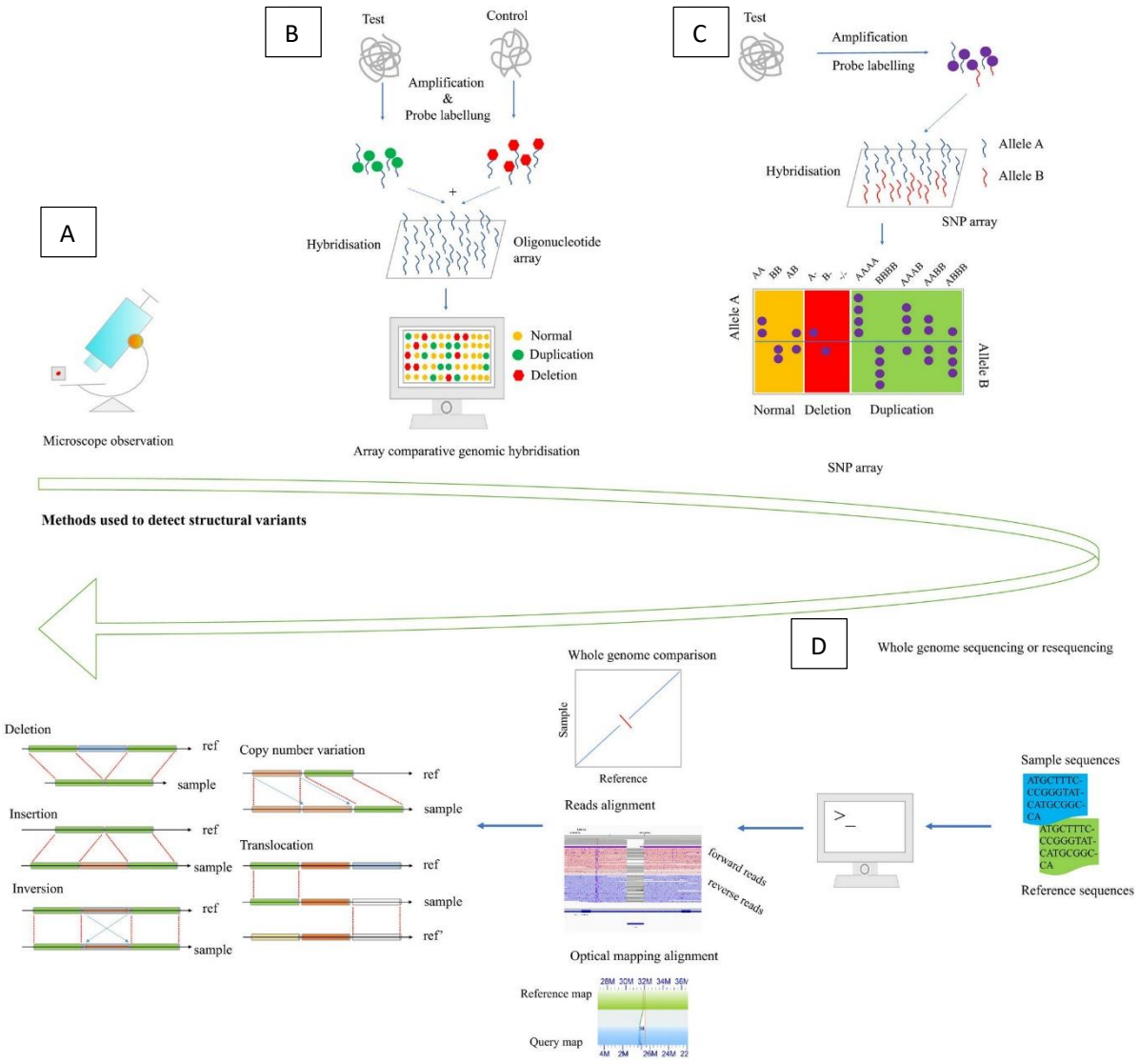


Figure 7 : Evolution des méthodes utilisées pour la caractérisation des variations structurales. (A) Observation au microscope, (B) CGH, (C) SNP, (D) Séquençage et cartographie optique (Yuan et al., 2021)

Au moment où nous avons commencé notre étude (début 2018), la seule étude publiée (Cao *et al.*, 2014) et celles qui étaient en cours (présentations PAG XXVI et discussions avec différents responsables de chez Bionano Genomics) relatant de l'utilisation de cartes optiques pour la détection de variations structurales n'étaient réalisées que chez l'Homme.

4. Quelle technologie utiliser pour la détection des variations structurales : ONT ou Bionano ? A chacune ses objectifs !

La proximité avec l'EPGV (relationnelle et physique), l'acquisition d'instruments de séquençage et de cartes optiques de dernière génération et le fait qu'au début du projet aucune publication ne relatait de ce sujet chez les plantes, ont fait que j'ai proposé à Patricia Faivre-rampant et Marie-Christine Le Palier (INRAE, EPGV) d'explorer l'identification des variations structurales soit par la technique de séquençage ONT soit à l'aide de cartes optiques obtenues avec la technologie Bionano Genomics, et de comparer les deux. Le but était de savoir si ces deux technologies offraient des complémentarités ou si clairement une de ces méthodes permettait une meilleure détection des SVs. Nous avons choisi de mener notre étude sur deux des écotypes les plus étudiés de l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana* : Columbia-0 (Col-0) and Landsberg *erecta* 1 (L*er*-1). Nous avons pris le choix de nous focaliser sur la comparaison des technologies ONT et Bionano dans la mise en évidence des variations structurales de ces deux génomes, sans chercher à établir un catalogue exhaustif des SVs de ces deux génotypes.

Après avoir générer des assemblages de L*er*-1 à partir de données ONT et de cartes optiques après marquage de l'ADN par l'enzyme DLE-1 (protocole DLS), nous avons obtenu une liste de variations structurales pour chacun des assemblages par comparaison avec la séquence de référence de Col0-TAIR10.1 (Sloan, Wu et Sharbrough, 2018). Le but de ce travail étant une étude comparative des deux technologies, nous avons appliqué des filtres de sélections des SVs établis à une taille supèrieure à 1kb, limite de détection des cartes optiques. Les analyses par les deux technologies révèlent une prédominance des inversions, délétions et inversions qui sont réparties de manière homogène le long des bras des chromosomes. Néanmoins, les SVs mises en évidence spécifiquement par la technologie ONT le sont essentiellement dans les régions centromériques et peritélomériques. En revanche, les SVs détectées uniquement par la technologie Bionano concerne essentiellement des grands évènements (translocation et larges inversions/délétions/insertions). En regardant l'impact de ces SVs sur les gènes, nous avons constaté que les SVs identifiées par ONT touchaient préférentiellement des gènes intervenant dans une réponse de défense et des gènes de résistance. Un tableau résumant l'ensemble des performances des deux technologies est presenté Tableau 1.

	Technologies	
	ONT	Bionano
Assemblage/Obtention de cartes optiques	√√	√√
1kb < SV <50kb		
Déletion	√√	√
Insertion	√√	√
Inversion	√	√√
Translocation	NA	√
SV >50kb		
Déletion	+	++
Insertion	+	++
Inversion	-	++
Translocation	NA	++
Localisation des SVs		
Région génique	++	++
Région complexe	+	++
Autres critères		
Accès à la séquence des SVs	++	NA
Compétences en bioinformatique	+	++
Visualisation des SVs	+	++

Tableau 1: Comparatif de la technologie de séquençage ONT et celle de cartographie optique de Bionano Genomics pour la detection des variations structurales. NA: Non applicable.

Lors de cette étude, nous avons mis en évidence le fait que la technologie Bionano permettait la détection d'un grand nombre de SVs en concordance avec la technologie ONT. Ce haut taux de détection est lié à la chimie utilisée qui repose sur un marquage direct et non plus la méthode NRLS (Nicking, Repair, labeling, Staining) comme cela l'était avec l'enzyme BspQI. En effet, une précédente analyse de cartographie optique du génome d'*A. thaliana* KBS-Mac-74 (Michael *et al.*, 2018), obtenue avec un marquage NRLS, avait générée, avec le protocole DLS, 10 fois plus de cartes que dans notre étude. Par ailleurs, lors de la mise sur le marché de l'instrument Saphyr et de cette nouvelle chimie, j'ai fait partie des 10 bêta-testeurs et confirmé les importantes améliorations apportées par Bionano Genomics. Les résultats des tests que j'avais faits avaient été présentés lors de la conférence « Plant and Animal Genome XXVI, San Diego » de 2018. Cette technologie permet aussi de caractériser des grands évènements de structure, en ayant une vision assez large des réarrangements. En revanche, le manque d'accès à la séquence est une limite des cartes optiques et la recherche de variations structurales ne peut se faire que s'il existe un génome de référence d'assez bonne qualité et génomiquement proche de l'écotype étudié. Quant à la

technologie ONT, elle permet d'avoir une meilleure identification des SVs, notamment dans les régions géniques et dépourvues de séquences répétées. Pour conclure, la technologie ONT semble particulièrement adapté pour des études de population chez les plantes tandis que la technologie des cartes optiques rend accessible l'étude de la plasticité des génomes. Ces deux technologies sont vraiment complémentaires et peuvent être utilisées indifféremment en fonction de la question scientifique posée et des ressources disponibles lors de l'étude des variations structurales.

L'ensemble de ces travaux a été valorisé par l'écriture d'un article qui vient d'être accepté par BMC Genomics (IF 3.97) et dont le manuscrit est présenté en Annexe 4. Comme annoncé précédemment, quand j'ai eu l'idée de faire cette comparaison de technologie, j'ai pris contact avec des spécialistes de la génomique des plantes, Patricia Faivre-Rampant et Marie-Christine Le Palier, localisée au sein du Genoscope. Tout au long de ce travail, ayant des compétences complémentaires, nous avons travaillé de concert avec Patricia pour guider dans ses analyses, Aurélie Canaguier (EPGV, INRAE), première auteure du papier. Bien que la trame du papier ait été écrite par Aurélie, je me suis énormément impliquée dans l'écriture du papier, les révisions apportées et dans les réponses aux reviewers. Toute l'implication que j'ai eue dans cette étude justifie ma place en tant que dernière auteure de cet article.

III. Les microplastiques en milieu marin

1. Contexte de la pollution plastique en milieu marin

Depuis les années 1950, le plastique est devenu un matériau indispensable dans notre quotidien. De par ses qualités remarquables (telles que sa facilité de mise en forme, son prix de revient, sa résistance mécanique, sa capacité à être imputrescible…), sa production mondiale a subi un essor exponentiel jusqu'à atteindre près de 400 millions de tonnes sur la seule année 2018/2019 (Carus *et al.,* 2020). Les plastiques peuvent être d'origine pétrochimique (plastiques dits conventionnels) ou issus de biomasse (ressources biologiques animales, végétales ou bactériennes) (appelés encore bio-sourcés), ces derniers ne représentant qu'environ 1% des plastiques produits dans le monde. Malheureusement, cette production considérable n'est pas accompagnée d'une gestion adéquate des déchets générés et s'intègre peu dans une économie circulaire. A l'heure actuelle, les méthodes de « gestion » reposent essentiellement sur le recyclage (~30% à l'échelle mondiale), la valorisation (~40%) ou encore l'enfouissement (~30%), chaque pays optant préférentiellement pour l'une ou l'autre des solutions (Plastic Europe 2020). De par la pollution qu'elle engendre, la quantité de déchets plastiques enfouie a fortement diminué ces dernières années tandis que la valorisation et le recyclage ont augmenté. Néanmoins, notons que le recyclage mécanique des plastiques à l'infini n'est pour l'instant possible qu'en principe et le recyclage chimique (processus de pyrolyse ou thermolyse) et enzymatique restent des méthodes peu utilisées dû à la part du défi technique posé par les polymères dont les monomères sont liés par des liaisons thermodynamiquement très stables. En dehors de ces moyens de gestion des plastiques, d'autres méthodes se développent comme le compostage. Contrairement au compostage domestique, le procédé industriel nécessite des conditions de température et d'humidité rigoureusement contrôlées afin de favoriser les microorganismes responsables de la dégradation des matières, en plus de la mise en place d'un système de collecte et de tri spécifique. Ainsi, on estime que plus de 30% des déchets plastiques produits à travers le monde sont éliminés de manière inappropriée et jetés de façon irresponsable (Skoczinski *et al.,* 2021). De ce fait, les déchets plastiques finissent par se retrouver dans l'environnement et le réceptacle final de la grande majorité des déchets plastiques terrestres non traités est l'Océan. On estime ainsi qu'entre 4,8 et 12,7 millions de tonnes de plastiques sont déversées dans la mer chaque année (Jambeck, *et al.,* 2015). Cette pollution plastique est devenue un problème mondial puisque ses impacts sur l'environnement causent des dommages irréversibles sur la faune et sur la flore à l'échelle planétaire (Jambeck *et al.,* 2015 ; Chapron *et al.,* 2018 ; Ghiglione *et al.,* 2020) lié à la non biodégradabilité des plastiques conventionnels. Par ailleurs, une autre conséquence de cette pollution plastique, et potentiellement l'une des plus significatives pour l'environnement marin, est le transport d'espèces invasives et/ou pathogènes. En effet, les plastiques jouent le rôle de radeau pour de nombreux organismes qui s'accrochent à sa surface et des études ont montré l'impact du plastique comme vecteur de dispersion des espèces marines (Carlton *et al.,* 2017 ;

Amaral-Zettler *et al.,* 2020 ; pour une revue : Garcia-Gomez *et al.,* 2021) qui peut aussi être lié au transport d'espèces potentiellement pathogènes pour l'homme ou pour les animaux marins (Silva *et al.,* 2019 ; Whittington *et al.*, 2021).

2. La plastisphère

La Plastisphère, terme proposé par Zettler et ses collaborateurs (Zettler et al.,2013) et largement repris depuis, représente l'ensemble des organismes colonisant les particules de plastiques en milieu marin. Cette communauté se distingue de celle de l'eau environnante, qu'elle soit sous forme libre ou attachée aux particules organiques (Bryant *et al.*, 2016 ; Dussud *et al.*, 2018a). Lié au fait que l'existence de niches écologiques des communautés bactériennes dans l'environnement marin est souvent attribuée aux facteurs environnementaux (salinité, température, profondeur) (Ghiglione *et al.*, 2012), les communautés microbiennes formant la plastisphère vont être influencées par leurs localisations géographiques, les variations saisonnières et éventuellement par le type de polymère (Oberbeckmann *et al.*, 2016 ; Frère *et al.*, 2018 ; Oberbeckmann *et al.*, 2018 ; Carson *et al.*, 2013 ; Basili *et al.*, 2020). Cependant, les facteurs impactant le plus l'analyse de cette communauté sont (i) l'environnement dans lequel elles sont incubées ; (ii) la méthodologie utilisée pour la collecte, l'extraction d'ADN et le séquençage et (iii) le temps d'incubation utilisé (Wright *et al.*, 2021). Les communautés microbiennes marines qui colonisent les surfaces et les polymères, y compris les plastiques, sont complexes et connues pour passer par différentes étapes, même si les communautés des plastisphères diffèrent fortement des communautés microbiennes des autres surfaces inertes, notamment dans le cadre des assemblages de biofilms matures (Wright *et al.*, 2020). Dès qu'un plastique se retrouve dans l'environnement marin, il subit une colonisation microbienne liée à l'adsorption rapide de molécules organiques dissoutes présentent dans la colonne d'eau, permettant ainsi la fixation des cellules bactériennes primo-colonisatrices. Une succession de phases de croissance d'un biofilm va ensuite se mettre en place avec la sécrétion d'une matrice extracellulaire, la croissance des cellules, et le recrutement d'autres organismes (Dobretsov, 2010 ; Wright *et al.,* 2020, Figure 8). L'hydrophobicité et d'autres propriétés du substrat (cristallinité, structure, rugosité, température de fusion et élasticité) peuvent jouer un rôle dans la sélection des communautés bactériennes aux premiers stades de la colonisation (Pompilio *et al.* 2008; Salta *et al.* 2013), mais probablement dans une moindre mesure lorsque le biofilm devient mature (Dussud *et al.* 2018b). Durant cette succession de phases, il y aura tout d'abord une prédominace des α proteobacteria et γ proteobacteria dans la phase « primo-colonisatrice » (Salta *et al*., 2013 ; Oberbeckmann *et al.*, 2015; Dussud *et al.*, 2018a) qui sera suivi par une prédominace des Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, et des Planctomycetes lors de la phase de croissance du biofilm (Salta *et al.*, 2013) pour arriver à un biofilm mature qui semble rester stable pendant plusieurs mois (Kirstein *et al.*, 2018).

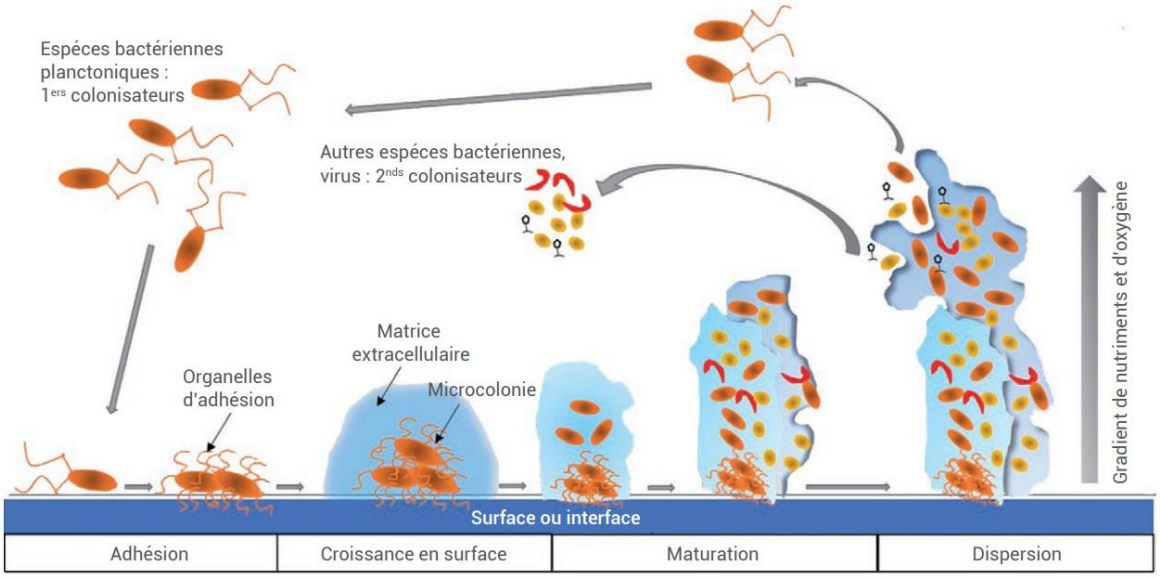


Figure 8. Phases successives de la formation d'un biofilm bactérien. (Tremblay et al., 2014)

Liée à cette succession de phases, l'efficacité de la communauté microbienne à dégrader un composé peut ne pas être mise en évidence. C'est pour cela qu'il est important de suivre le processus de dégradation en fonction du temps, ce qui est impossible à réaliser sur des échantillons issus d'expéditions, les biofilms des polymères étant matures, présents parfois depuis plusieurs années et soumis aux facteurs environnementaux (Wright *et al.,* 2021).

3. La dégradation des plastiques

Outre la colonisation, un plastique va subir en milieu marin deux phases de dégradation : une abiotique et l'autre biotique. La dégradation abiotique fait intervenir des facteurs environnementaux tels que les rayons ultraviolets ou la température (Sudhakar *et al.,* 2008 ; Singh and Sharma, 2008), les vagues et les courants (Briassoulis, 2007), ou encore le pH et l'hydrolyse (Gu and Gu, 2005) qui vont altérer la surface du polymère et le « veillir ». Quant à la dégradation biotique (appelée biodégradation), c'est un processus biochimique aérobique ou anaérobique complexe, qui se traduit par une conversion du carbone organique en biogaz (CO_2 , CH_4 , H_2S, NH_4 et H_2) (Mohee *et al.*, 2008) et en biomasse associée à l'activité d'une communauté de micro-organismes (bactéries, archées, champignons) capable d'utiliser le plastique comme source de carbone (Shah *et al.,* 2008). Pour certains polymères, la biodégradation est facilitée par une dégradation abiotique qui fragilise leur structure en révélant la rugosité, les fissures et les changements moléculaires (İpekoglu *et al.*, 2007; Skoczinski *et al.*, 2021). Le processus de biodégradation se définit par quatre grandes étapes (Dussud et Ghiglione, 2014) : La biodétérioration, la biofragmentation, l'assimilation et la minéralisation (Figure 9).

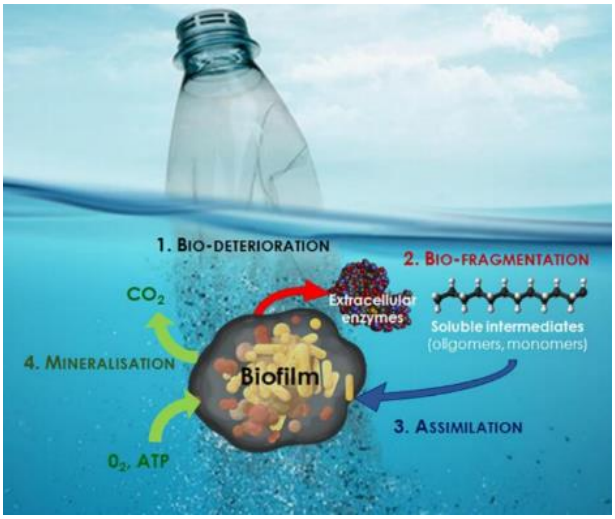


Figure 9 : Schéma représentant les étapes de la biodégradation des plastiques en milieu marin (Dussud et Ghiglione 2014)

L'étape initiale, la biodétérioration, correspond à un phénomène engendré par le biofilm bactérien qui se développe sur le polymère. En effet, des contraintes mécaniques liées à cette croissance, vont augmenter la taille des pores et former des fissures à la surface modifiant les propriétés physiques du plastique ainsi que sa microstructure. S'en suit la phase de biofragmentation pendant laquelle les bactéries du biofilm vont sécréter des enzymes dépendantes de la nature du polymère (lipases, estérases, catalases…). L'intervention de ces enzymes extracellulaires va permettre de réduire les polymères en oligomères et/ou monomères. L'étape d'assimilation correspond à l'internalisation de ces oligomères/monomères de taille inférieure à 600 Daltons. La cellule va alors pouvoir utiliser ces substrats comme source de carbone pour leur métabolisme. La phase finale de minéralisation correspond donc à l'excrétion de métabolites oxydés (CO_2, N_2, CH_4 et H_2O) par les bactéries.

La capacité des micro-organismes à détériorer ou à dégrader le plastique a été observée dans de nombreuses études (Shah *et al.*, 2008; Krueger *et al.*, 2015; Jacquin *et al.*, 2019 pour une revue). Les Arthrobacters, les Corynebacterium, les Micrococcus, les Pseudomonas, les Rhodococcus, et les Streptomyces sont à ce jour les principaux taxa bactériens identifiés comme pouvant utiliser le plastique comme seule source de carbone et d'énergie, mais notons que les expérimentations n'ont été menées qu'en condition culturale. Par ailleurs, très peu d'études existent à ce jour en milieu marin qui n'est pas l'environnement le plus favorable à une forte biodégradation comparé au compost (industriel ou domestique) ou à la digestion anaérobie (Figure 10). Liés à la structure des plastiques conventionnels, les taux de dégradation par les micro-organismes y sont extrêmement faibles, même dans des conditions optimisées de laboratoire.

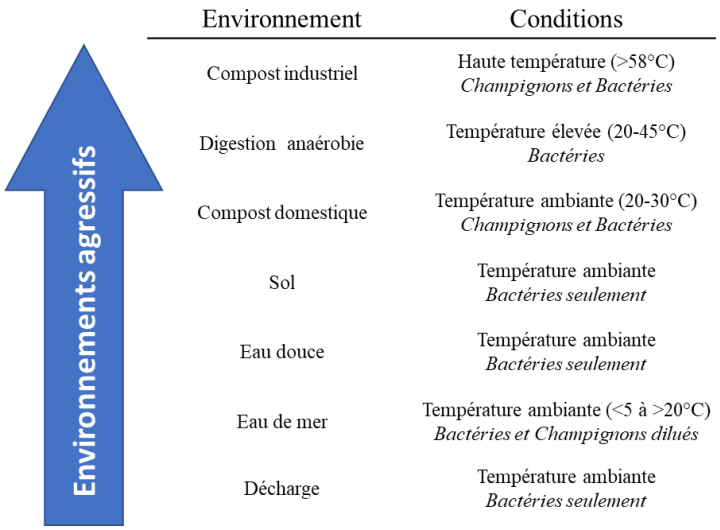


Figure 10 : Comparaison des différents environnements influençant le taux de biodégradation des plastiques. (Thèse de Justine Jacquin, Ecotoxicologie microbienne des plastiques en mer : Colonisation et biodégradation par la plastisphère, oct 2020)

4. De l'analyse de la plastisphère aux preuves de dégradations

Les études des deux articles publiés et présentés ci-après abordent le suivi de l'évolution de la plastisphère au cours du temps et apportent des preuves de biodégradation à partir d'approches pluridisciplinaires de plusieurs plastiques biodégradables susceptibles d'être utilisés comme des substituts aux plastiques conventionnels. Le but du projet de l'article de Odobel et collaborateurs (Odobel *et al.,* 2021, Annexe 5) était de caractériser les phases de colonisation de la surface des microplastiques et la formation des biofilms constituant la platisphère. Les différents polymères étudiés lors de cette étude étaient le PolyEthylène (PE, non-biodégradable issus de la pétrochimie), des polyéthylènes contenant des pro-oxydants (OXO) avec (AA-OXO) ou sans (OXO) vieillissement artificiel, le Poly(acide lactique) (PLA), le Polycaprolactone (PCL), le PolyStyrène (PS) et le poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) comme représentant des Polyhydroxyalcanoates (PHA) (Figure 11).

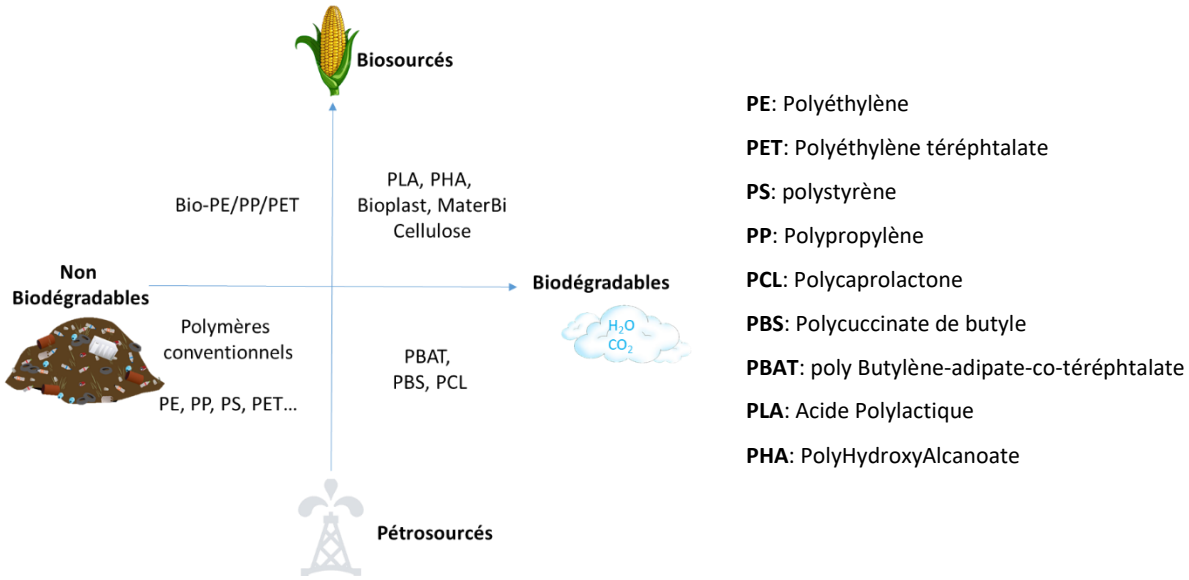


Figure 11 : Schéma représentant les différentes classes de plastiques selon leur origine et leur biodégradabilité

Chaque polymère a été incubé séparément pendant une durée maximale de 6 semaines dans des aquariums à circuit ouvert directement alimentés en eau de mer de la baie de Banyuls. Les AA-OXO ont la même formulation que les OXO mais ont été vieillis thermiquement durant 48 ou 144 jours dans un four à 70°C. Des prélèvements des plastiques de ces aquariums ont été réalisés au bout de 3, 10, 31, 74, 116 ou 206 jours. En parallèle des analyses d'abondance (microscopie à épifluorescence et cytométrie de flux), d'activité intra- (incorporation de la Leucine tritiée) et extra-cellulaire (dosage de lipase, aminopeptidase et de β-glucosidase), des analyses de diversité (métabarcode (MetaB)) ont été réalisées. Vous constaterez lors de la lecture que la diversité des communautés bactériennes varie en fonction de la biodégradabilité des plastiques et que les analyses d'abondance et d'activité intra- et extracellulaire confortent cette distinction entre les deux catégories de polymères. Une seule exception, dans nos conditions, concerne le PLA.

Lors de ce travail, je me suis particulièrement attachée à analyser toute la diversité microbienne de la plastisphère des différents polymères en me focalisant sur les différences de composition spécifique des espèces structurales entre les échantillons ainsi que sur la recherche bibliographie associée. Par ailleurs, j'ai guidé la premiere auteure, Charlène Odobel (post-doc du LOMIC) dans la rédaction de l'article concernant l'agencement des résultats et les messages importants à faire passer. Comme ce travail ayant été initié avant mon arrivée dans le laboratoire, je n'ai pas la dernière place dans cet article mais l'avant dernière.

Le travail de l'article de Jacquin et collaborateurs (Jacquin *et al.,* 2021, Annexe 6) s'intègre directement dans le cadre de la recherche d'alternatives aux plastiques conventionnels utilisés dans les cotons-tiges. C'est un projet qui a été financé par le ministère de la transition écologique et solidaire, afin d'étudier la biodégradation en milieu imitant les conditions marines (microcosme) de plusieurs polymères pendant

plusieurs mois. Les différents matériaux proposés étaient : le PLA, le poly butylène-adipate-co-téréphthalate (PBAT), le polysuccinate de butyle (PBS), le PHBV, le Bioplast et le Mater-Bi (ces deux derniers étant des mélanges de polymères effectués par une entreprise et leurs structures exactes ne sont donc pas connues) (Figure 7). Par ailleurs, le polypropylene (PP) et la cellulose ont été utilisés respectivement comme témoins non-biodégradable et biodégradable. Après avoir été incubé pendant plus de 40 jours, la plastisphère de ces polymères a été utilisée comme inocula de tests de biodégradation sur une période de 94 jours. Cet article propose en conclusion des substituts pour remplacer le polymère utilisé dans les cotons-tiges, comme par exemple le co-polymère PHBV.

Tout comme pour l'article de Charlène Odobel présenté ci-dessus, j'ai largement contribué aux observations décrites dans le manuscrit concernant la variabilité des communautés de la plastisphère en fonction des polymères en orientant Justine Jacquin (étudiante en thèse que j'ai co-encadrée) dans les analyses et les recherches bibliographiques à effectuer. Par ailleurs, je l'ai guidée tout au long de l'écriture de l'article.

IV. La biodégradation des polyhydroxyalcanoates (PHA)

1. PHA : Polymères biosourcés et biodégradables

Le premier polyhdroxyalcanoate a été isolé en 1926 par Maurice Lemoigne à l'Institut Pasteur à partir de la bactérie *Bacillus megaterium*. Les PHA sont des polyesters synthétisés par une large gamme de micro-organismes (bactéries, archées et champignons) à partir de diverses sources de carbone renouvelables (sucre, acides, huiles végétales) (Peña *et al.,* 2014 ; Ali et Jamil, 2016 ; Tebaldi *et al.,* 2019). A ce jour, plus de 300 espèces microbiennes ont été identifiées et 150 monomères différents d'hydroxyalcanoates ont été recensés (Keshavarz et Roy 2010), laissant supposer une variété de propriétés et une multifonctionnalité (Castro-Sowinski *et al.,* 2010). Ces derniers sont classés selon la longueur du radical R, distinguant ainsi les PHA à chaîne latérale courte (scl) constituée de 3 à 5 carbones, les PHA à chaîne latérale moyenne (mcl) constituée de 6 à 14 carbones et les PHA à chaîne latérale longue (lcl) constituée de plus de 14 carbones (Tableau 2). Par ailleurs, il est possible de produire des copolymères en mélangeant des monomères à courtes et/ou moyennes chaînes.

Groupement R		Nombre de C	PHA	Catégorie
Methyl (HB)	CH_3	4	Poly-3-Hydroxybutyrate	PHA_{SCL}
Ethyl (HV)	CH_2-CH_3	5	Poly-3-Hydroxyvalerate	
Propyl (HHx)	$(CH_2)_2$-CH_3	6	Poly-3-Hydroxyhexanoate	PHA_{MCL}
Butyl (HHp)	$(CH_2)_3$-CH_3	7	Poly-3-Hydroxyheptanoate	
Pentyl (HO)	$(CH_2)_4$-CH_3	8	Poly-3-Hydroxyoctanoate	
Hexyl (HN)	$(CH_2)_5$-CH_3	9	Poly-3-Hydroxynonanoate	
Heptyl (HD)	$(CH_2)_6$-CH_3	10	Poly-3-Hydroxydecanoate	
Octyl	$(CH_2)_7$-CH_3	11	Poly-3-Hydroxyundecanoate	
Nonyl (HHD)	$(CH_2)_8$-CH_3	12	Poly-3-Hydroxydodecanoate	
Decyl	$(CH_2)_9$-CH_3	13	Poly-3-Hydroxytridecanoate	
Undecyl	$(CH_2)_{10}$-CH_3	14	Poly-3-Hydroxytetradecanoate	
Dodecyl	$(CH_2)_{11}$-CH_3	15	Poly-3-Hydroxypentadecanoate	PHA_{LCL}
Tridecyl	$(CH_2)_{12}$-CH_3	16	Poly-3-Hydroxyhexadecanoate	

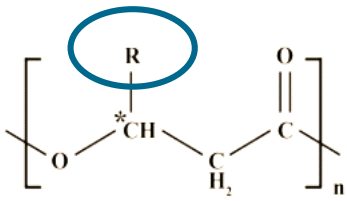


Tableau 2 : Classifications des différents PHA. La nature du groupe est associée à la chaine latérale ***R*** *directement reliée aux substrats carbonés (glucose, fructose, cellulose, acides et acides gras…) utilisé par le micro-organisme et à la nature de son enzyme PHA synthase*

C'est la chaîne carbonée, variable selon la source de carbone (glucose, fructose, cellulose, acides et acides gras…), qui va définir la catégorie du PHA (scl ou mcl). Si la source de carbone est un sucre, les bactéries seront susceptibles de biosynthétiser des scl tandis que si le substrat est un acide gras, les PHAs produits seront des mcl (Bruzaud S, 2021, Figure 13). Notons qu'à ce jour, aucune bactérie capable de synthétiser aussi bien des scl que des mcl n'a été mise en évidence. Le groupe R, peu encombrant dans les scl, va leur conférer une meilleure cristallinité, tandis que dans les mcl, l'encombrement stérique va

diminuer la cristallinité jusqu'à obtenir un polymère amorphe comme pour le poly(3-hydroxyheptanoate) (PHHp) (Figure 12).

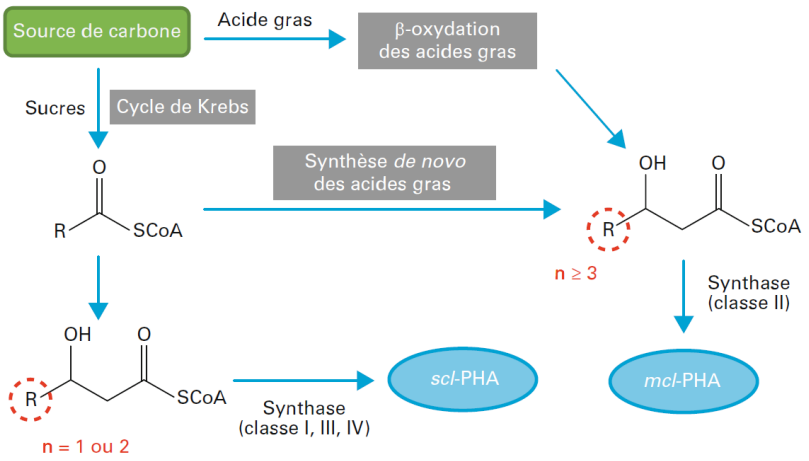


Figure 12 : Mécanisme simplifié de biosynthèse des PHA (R = CnH2n+1) (Bruzaud, 2021).

Il a été démontré que les PHA sont biodégradables dans de nombreux écosystèmes comme les sols, la mer, le compost et les boues d'épuration (Eubeler *et al.,* 2009). Ils sont stockés dans le cytoplasme dans des granules appelés « carbonosomes » (Mezzolla *et al.,* 2018). Les polymères sont des molécules de réserve produites par les micro-organismes quand ils se retrouvent dans un environnement limité en nutriments essentiels (notamment l'azote, le magnésium, le phosphore ou l'oxygène) mais avec un surplus d'apport en carbone (Martinez-Tobon, 2019). Outre le fait qu'ils soient totalement biodégradables en milieu naturel, les PHA présentent de nombreux avantages grâce à leur propriétés physico-chimiques qui dépendent de leur composition et de leur cristallinité : (i) ils sont hydrophobes et résistants aux UV, (ii) ils ont une perméabilité à l'eau et à l'oxygène faible, (iii) ils peuvent être peu déformables en raison de leur cristallinité élevée et (iv) leur production ne nécessite pas de ressources finies à l'inverse des plastiques pétro-sourcés (Sharma, Sehgal, and Gupta, 2021). A ce jour, l'un des PHA le plus couramment utilisé est le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). Le PHB présente des propriétés mécaniques comparables à celles du polypropylène (telles hydrophobicité et faible perméabilité) ainsi qu'un haut potentiel pour des applications d'emballage alimentaire, avec une meilleure imperméabilité à l'eau que le PP et formant une barrière à l'oxygène plus efficace que le PET et le PP (Rajan *et al.,* 2018). Cependant, le point de fusion de ce polymère élevé est proche de sa température de dégradation thermique (Reis *et al.,* 2003). C'est pour cette raison que le copolymère, le poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate, synthétisé par de nombreuses espèces de micro-organismes (Wang *et al.,* 2013; Tebaldi *et al.,* 2019), est couramment utilisé. Ces dernières années, la production de PHA s'est développée et présente un intérêt commercial et industriel croissant en tant que substitut biodégradable aux plastiques conventionnels. Le premier secteur exploitant les PHA est le médical

(implants, sutures, appareils médicaux corporels), ces plastiques étant autorisés par la Food and Drug Administration du fait de leur biocompatibilité (Boesel *et al.,* 2014). Les domaines de l'emballage (quand ces derniers ne peuvent être ni recyclés, ni réutilisés), de l'agriculture et de l'horticulture, de la pêche et de la conchyliculture, ou encore du textile, utilisent de plus en plus ces polymères. Le marché des PHA se développe depuis les 30 dernières années, avec une croissance de plus de 14.2% les 5 prochaines années (https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html). Cependant, le coût de production de ces polymères reste 2 à 5 fois plus élevé qu'un plastique d'origine pétrochimique, allant de nos jours de 2,2 à 5€/kg contre moins de 1€/kg pour les plastiques conventionnels (PET, PE, PVC, PS et PP) (Gholami *et al.,* 2016). Néanmoins, en moins de 10 ans, le coût de production du PHA a chuté d'un facteur allant jusqu'à 5 (~10-12 € en 2003, Gholami *et al.,* 2016) en utilisant une source de carbone pour les microorganismes producteurs issue de déchets comme cela était prédit par Obruca et ses collaborateurs (Obruca, 2010). S'intéresser à la biodégradation de ces polymères c'est rentrer dans un concept d'éco-conception.

Les PHA sont dégradés par de nombreux micro-organismes (Jacquin *et al.,* 2019). Cette dégradation est activée par une enzyme clé appelée dépolymérase, PhaZ (Jendrossek et Handrick, 2002 ; Jendrossek, 2005). Les PHA dépolymérases sont des carboxylestérases appartenant à la famille des hydrolases α/β (Jendrossek et Handrick 2002). Les PhaZ extracellulaires (ePhaZ) se composent d'un signal peptidique (SP), d'un grand domaine catalytique N-terminal (Cat), d'une courte région de liaison (linker) qui permet de faire la liaison entre le domaine catalytique et le domaine de liaison au substrat (SBD, substrate binding domain) (Jendrossek, Schirmer and Schlegel, 1996 ; Jendrossek and Handrick, 2002 ; Jendrossek, 2005) (Figure 14). Le domaine catalytique est constitué d'un site actif composé d'une triade d'acides aminés (Sérine (S), Aspartate (D) et Histidine (H)) strictement conservée. La disposition par rapport à la triade d'une autre histidine (contenant le trou oxyanion) va catégoriser les ePhaZ en deux groupes distincts (Jendrossek 1997 ; Jendrossek and Handrick, 2002).

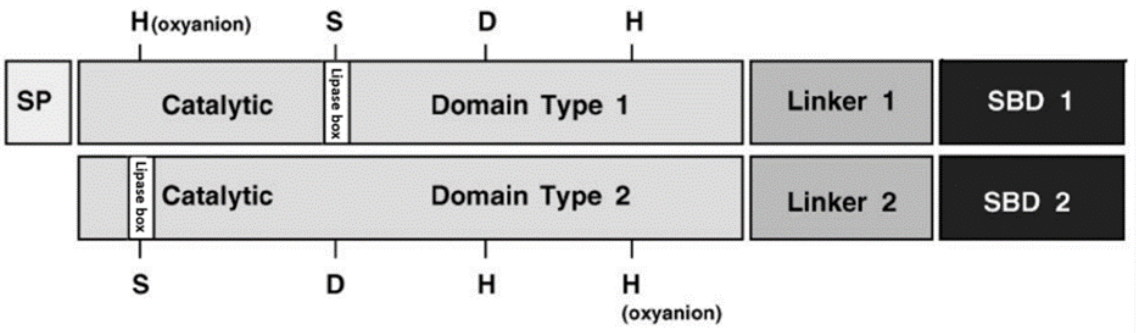


Figure 13 : Présentation des deux groupes de ePhaZ spécifique des PHAscl catégorisés en fonctions du placement de l'histidine (oxyanion hole) par rapport à la triade catalytique (Serine, Asparagine, Histidine). (Figure issue de Jendrosek and Handrick, 2002).

A ce jour, un grand nombre de dépolymérases externes (ePhaZ) ont été identifiées (DED database, Knoll *et al.,* 2009) mais très peu issues du milieu marin et le mécanisme mis en place par la cellule pour utiliser le PHA comme source de carbone reste totalement inexploré. Par ailleurs, ces enzymes permettent essentiellement la biodégradation des PHAscl (Knoll *et al.,* 2009) et très peu d'enzyme PHAmcl ont été à ce jour identifiées (Schirmer et Jendrosseck, 1994 ; Kim et al., 2005).

2. Alteromonas sp. : dégradeur de PHA ?

Bien que différentes espèces bactériennes aient été identifiées pour leur capacité à biodégrader des polymères pétro et bio-sourcés (revue de Jacquin *et al.,* 2019), les voies métaboliques impliquées ont rarement été validées expérimentalement. L'intérêt de telles études a été révélé notamment par la découverte de l'enzyme PETase de *Ideonella sakaiensis* (Bornscheuer, 2016), qui permet aujourd'hui de proposer des solutions industrielles à la pollution plastique (Tournier *et al.*, 2020 ; https://www.carbios.com/fr/) Parmi les substituts testés dans l'article de Jacquin et ses collaborateurs (Jacquin *et al.,* 2021), le PHBV a été identifié comme le polymère ayant le meilleur taux de dégradation. Afin de déterminer quels pouvaient être les acteurs de cette dégradation, plusieurs souches ont été isolées en laboratoire (après observation de la présence d'un halo de dégradation (Jendrossek, Schirmer, and Schlegel, 1996) lors de culture en milieu minimum gélosé contenant du PHBV en poudre comme seule source de carbonne) et se sont révélées être de bons candidats. Parmi elles, une souche d'Alteromonas, dont l'identification taxonomique s'est révélée correspondre à une nouvelle espèce du genre Alteromonas (nommée pour l'instant *Alteromonas* sp.), a été étudiée pour sa capacité à dégrader le PHBV. Cette approche s'est déroulée sur 40 jours et 6 points de prélèvements ont été effectués (T0, T5, T11, T16, T32 et T40). En utilisant des conditions de milieux d'eau de mer artificiel avec une pastille de PHBV comme unique source de carbone, des paramètres biologiques et physico-chimiques (halo de dégradation, production bactérienne, consommation d'O2, microscopie électronique et perte de masse) ont été mesurés. En parallèle, le séquençage complet du génome et des analyses d'expressions différentielles (RNASeq) ont été réalisés.

Le but du travail présenté ci-après était donc d'apporter toutes les preuves de l'activité de biodégradation du PHBV par *Alteromonas* sp. et de mettre en évidence les cascades des voies métaboliques mises en place lors de l'utilisation du polymère comme seule source de carbone.

A. Alteromonas sp. appartient à une nouvelle espèce

Le génome complet d'*Alteromonas* sp. a été obtenu à l'aide d'une stratégie d'assemblage hybride basée sur la complémentarité des deux méthodes de séquençage, Illumina et ONT, générant respectivement des

lectures courtes (~150 nt) et longues (~14kb). Les lectures courtes permettent d'obtenir un consensus de qualité généré après l'assemblage tandis que les lectures longues fournissent un squelette sur lequel les lectures courtes sont ancrées. Après assemblage des données, la séquence du génome complet circularisé a été obtenue et l'annotation automatique a été réalisée à l'aide de la plateforme Microscope (Vallenet *et al.*, 2006 ; Vallenet *et al.*, 2017). Le génome est constitué d'un chromosome circulaire de 5 332 999 pb avec une teneur en GC de 48,8 %. Toutes les caractéristiques générales de ce génome sont résumées dans le Tableau 3. Quatre clusters d'ARN ribosomal ont été identifiés avec le même ordre : 16S, 23S et 5S. Cependant, trois d'entre eux avaient un ARNt Ala et un ARNt Ile entre le 16S et le 23S.

Caractéristiques	Valeurs
Taille du génome (bp)	5,332,999
G+C (%)	48.8
rRNA	12
tRNA	58
tmRNA	1
misc_RNA	34
CDS	4805

Tableau 3: Caractéristiques générales du génome d'Alteromonas sp.

La séquence d'ARN ribosomique 16S a été utilisée pour établir l'affiliation de cette souche. Deux d'entre eux sont identiques (ALSP_rRNA6 et ALSP_rRNA10), mais les deux autres ont respectivement un (ALSP_rRNA3) et trois (ALSP_rRNA7) mésappariements. Le séquençage Sanger du 16rARN complet a validé la séquence des deux copies identiques. C'est cette séquence qui a été utilisée pour l'affiliation taxonomique (Figure 14).

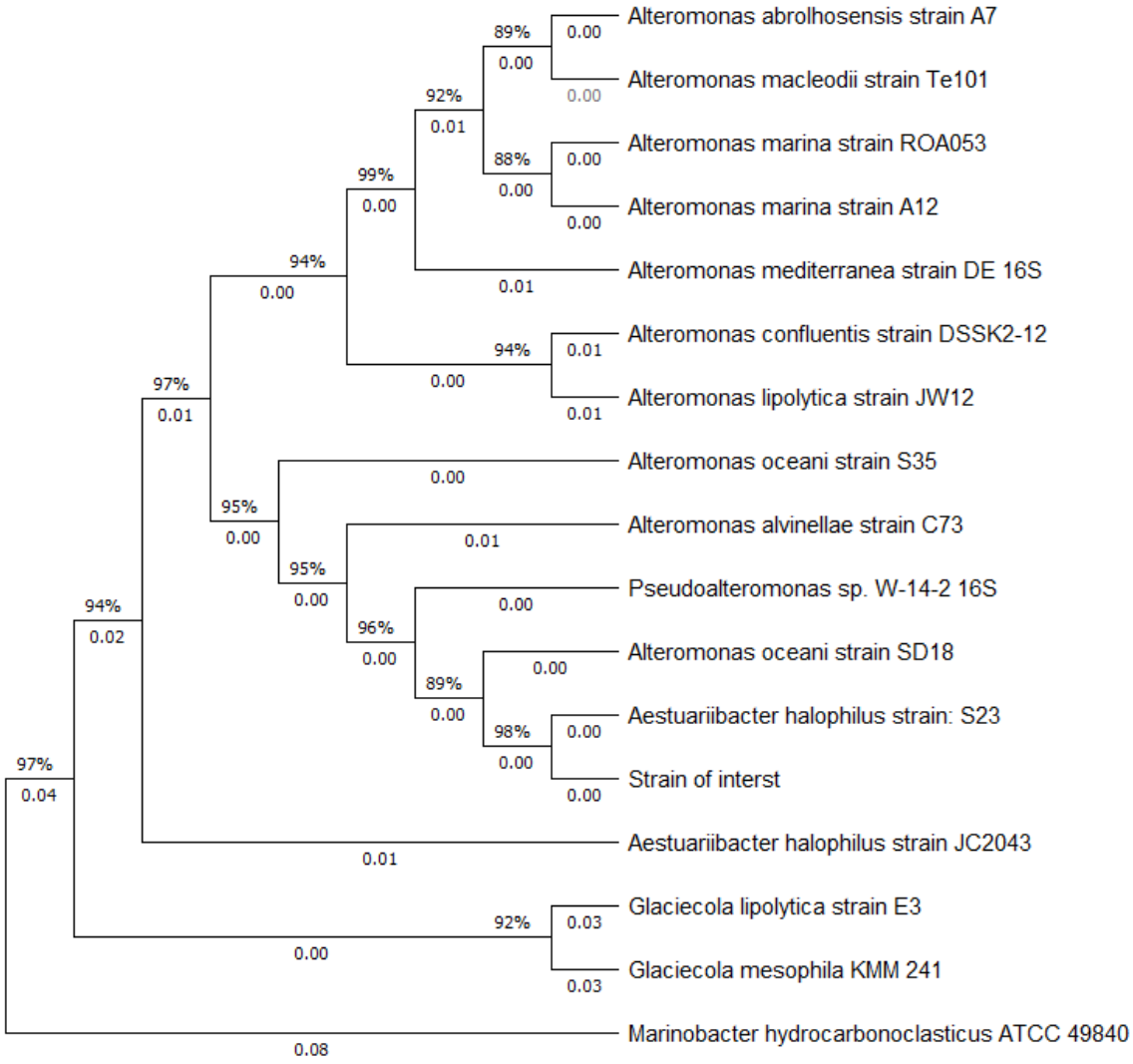


Figure 14 : Arbre phylogénétique de l'ARNr 16S comparant différents taxons à notre souche d'intérêt. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode de jointure voisine avec le logiciel MEGA7.

Comme le montre la Figure 14, la souche d'intérêt semble être étroitement liée à *Aesturiibacter halophilus* S23, une souche isolée de sédiments originaires de Corée (Yi, Bae et Chun, 2004). *A. halophilus* S23 a été identifiée comme une souche halophile et aérobie appartenant à la famille des Alteromonadaceae. D'autres souches isolées sur films de PHBH (Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate)) après 1 mois d'incubation dans le port de Takasago au Japon se sont également révélées être proches d'*Aestuariibacter halophilus* S23 (Moroshi *et al.*, 2018). Sur l'arbre phylogénétique, la souche JC2043 d'*Aestuariibacter halophilus* forme un clade monophylétique distinct au sein de la famille des Alteromonadaceae et se regroupe à distance des genres Alteromonas et Glaciecola. En revanche, *Aesturiibacter halophilus* S23 est regroupé avec plusieurs souches du genre Alteromonas, suggérant une erreur d'affiliation probable pour *A. halophilus* S23.

Pour approfondir davantage l'affiliation taxonomique de la souche d'intérêt, la GTDB-Tk (Genome Taxonomy Database toolkit, phylogénie hautement conservée concaténée par des protéines, à partir de 120 gènes marqueurs bactériens et 122 archéens) a été appliquée (Chaumeil *et al.*, 2020). La meilleure affiliation suggérée est une Alteromonas_A. Par conséquent, sur la base de l'arbre et de la taxonomie proposée par GTDB, nous avons nommé cette souche *Alteromonas* sp.

B. La dégradation du PHBV par Alteromonas sp.

Bien qu'*Alteromonas* sp. ait été sélectionnée pour sa capacité à dégrader le PHBV sur un milieu artificiel d'eau de mer avec de l'agar noble et du PHBV fondu comme source de carbone, différents paramètres ont été suivis pour estimer le degré de cette dégradation.

a. Paramètres biologiques et physico-chimiques

i. Consommation d'oxygène

Un total de 4 tubes contenant uniquement du milieu d'eau de mer artificielle (ASM), complété avec la souche (ASM-str), du PHBV (ASM-PHBV), ou les deux (ASM-str-PHBV), ont été suivis tout au long de l'expérience (Figure 15).

Les consommations d'oxygène ont été quasi inexistantes pendant toute la durée de l'expérience pour les témoins ASM et ASM-PHBV (0,25 et 0,2 µmol d'oxygène par jour respectivement), reflétant une activité de base. Pour l'ASM-str témoin, une légère augmentation de la consommation a été observée (0,43 µmol par jour) probablement due à l'utilisation du Tris contenu dans l'ASM comme source de carbone. L'ajout de Tris à 50 mM dans le milieu artificiel d'eau de mer maintient l'activité de dégradation en stabilisant le pH ayant tendance à diminuer en raison de la production de monomère d'acide (R)-3-hydroxybutyrique lors de la dégradation du PHBV (Ong, Chee et Sudesh, 2017 ; Martinez Tobon 2019). En revanche, la consommation d'oxygène a été en moyenne de 22,45 µmol par jour tout au long de l'expérience pour l'échantillon contenant la source de carbone et la souche (ASM-str-PHBV), reflétant l'activité métabolique aérobie de la souche. Pour éviter l'anoxie, ce tube stérile a été ouvert 3 fois pendant l'incubation.

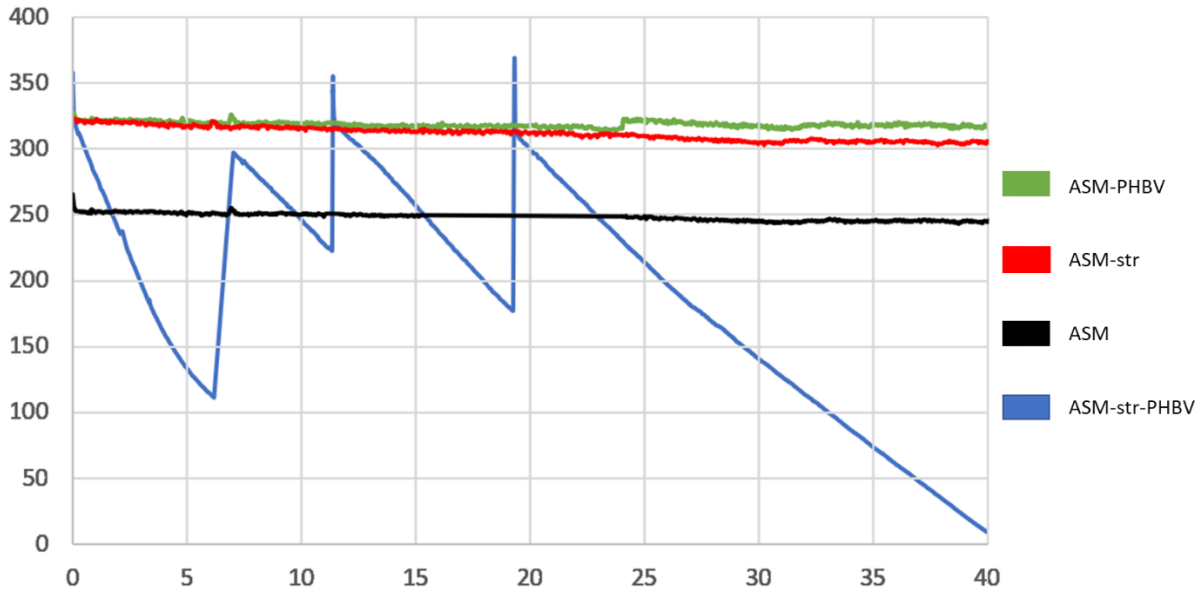


Figure 15 : Concentration d'oxygène dissous pendant l'incubation exprimée en µmol d'oxygène dissous/l par jour. ASM-PHBV et ASM sont les témoins négatifs.

ii. Souche activité bactérienne

L'inoculum initial qui a permis d'ensemencer toutes les conditions de l'expérience avait une activité bactérienne hétérotrophe (BP) de 3686,26 ngC/l/h (SD : 243) (Figure 16.(A), ASM-str).

L'activité de la souche incubée sans le PHBV était de 753,46 ng C/l/h après 5 jours en milieu minimum, et elle a chuté à 109,24 ng C/l/h après 40 jours (Figure 16.(A)). Ce résultat est cohérent avec l'observation de la consommation d'oxygène, qui ne montre pas d'activité significative de la souche sans source de PHBV.

L'activité de la souche attachée au morceau de PHBV a augmenté de 66% durant les 11 premiers jours d'incubation, atteignant le pic d'activité à 171843 ng C/m²/h (Figure 16.(B)). Ensuite, l'activité a diminué durant les 29 derniers jours d'incubation pour atteindre 28738 ng C/m²/h (SD : 507) après 40 jours (Figure 16.(B)). Le témoin négatif (ASM-PHBV) est resté à une activité de 0 ng C/m²/h (Figure 16.(B), ASM-PHBV).

L'activité hétérotrophe bactérienne dans le surnageant du tube contenant le PHBV avec la souche (ASM-str-surnageant-PHBV) a également été suivie tout au long de la période d'incubation, révélant que l'activité était également importante dans le surnageant (jusqu'à 48829 ng C /l/h) (Figure 16.(A)). Cette activité a diminué après 5 jours d'incubation mais est restée supérieure à 11012 ng C/l/h tout au long de l'incubation.

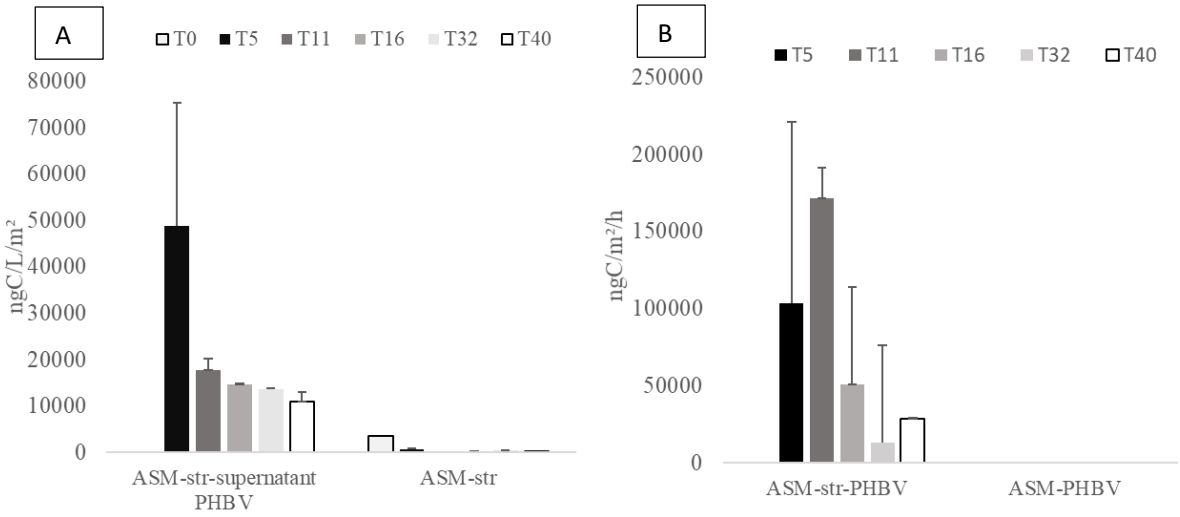


Figure 16 : Production bactérienne de la souche lors de l'incubation en milieu artificiel d'eau de mer (ASM) pour : (A) le contrôle négatif ASM-str et le surnageant de l'échantillon ASM-str-PHBV exprimé en ng C/l/h. (B) l'échantillon ASM-str-PHBV et le contrôle négatif ASM-PHBV exprimés en ng C/m²/h. Les points de prélèvement étaient le début d'incubation J0, après 5 jours (J5), après 11 jours (J11), après 16 jours (J16), après 32 jours (J32) et le ppoint final à 40 jours (J40).

iii. Perte de poids

Pour évaluer la quantité de polymère consommée au cours de l'expérience, 8 fragments de PHBV ont été pesés sur une balance de précision en début (J0) et en fin d'expérience (J40). Quatre de ces fragments ont été incubés en milieu artificiel d'eau de mer avec la souche (ASM-str-PHBV), le reste uniquement en milieu artificiel d'eau de mer (ASM-PHBV). Les polymères des échantillons ASM-PHBV avaient une augmentation moyenne de poids de 0,5 % (0,32 mg (SD 0,83)). En revanche, nous avons observé une perte de poids significative de ~14,6% (9,17 mg en moyenne (SD 2,01)) après 40 jours d'incubation pour les fragments de PHBV en présence de la souche (échantillons ASM-str-PHBV).

iv. Image de microscopie électronique à balayage

Après incubation, la souche colonise rapidement et de manière homogène le polymère et recouvre toute la surface après 5 jours d'incubation (Figure 17). Les images MEB à J5 et J40 montrent la formation d'un biofilm avec l'apparition de structures telles que la matrice extracellulaire ou les exopolysaccharides (EPS). A J5 et J40, la structure des fragments de PHBV révèle des fissures et une surface modifiée par rapport au J0. Les structures de surface du polymère observées à J40 sont appelées Sphérulite. Cette structure cristalline en forme de sphère est répartie sur toute la surface du polymère et peut être associée à sa biodégradation. La vision de la sphérulite indique que la partie amorphe du PHBV n'est plus présente et a donc été dégradée par la souche bactérienne. Le fragment de PHBV ayant passé 40 jours dans un milieu

artificiel sans la souche n'a présenté aucun changement visible au microscope par rapport au J0 (données non présentées).

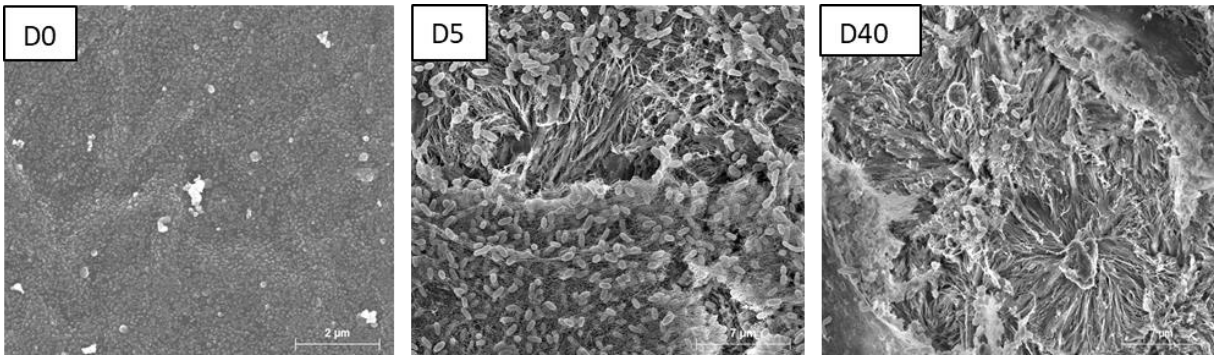


Figure 17 : Images de microscopie à balayage du PHBV au début de l'expérience (J0) et après 5 jours (J5) ou 40 jours (J40) de culture avec la souche dans le milieu artificiel. Des sphérulites sont observées sur le PHBV après 40 jours d'incubation.

b. Analyse génomique

Alteromonas sp. a été sélectionnée sur un milieu minimum contenant du PHBV comme source de carbone. L'annotation experte s'est donc concentrée sur la recherche de gènes impliqués dans la dégradation du PHBV. Ainsi, les séquences protéiques des 4805 séquences codantes (CDS) présentes dans le génome ont été comparées aux séquences de la base de données DED correspondant aux dépolymérases extracellulaires (Knoll *et al.*, 2009). Après comparaison des protéines, les analyses ont révélé une correspondance significative pour 3 séquences codantes (ALSP_2202, ALSP_2657 et ALSP_0697) avec une valeure allant de 4e-34 à e-110 et un pourcentage d'identité/positivité compris entre 34%/47% à 54% / 71% respectivement pour ALSP_0697 et ALSP_2202 (Tableau 4).

	Longueur des protéines	Longueur du match	Id.	Pos.	eval	Type
ALSP_2202	353	332	54%	71%	e-110	e-dPHAscl (domaine catalytique de type 2)
ALSP_2657	635	628	62%	75%	0.0	e-dPHAscl (domaine catalytique de type 1)
ALSP_0697	339	287	34%	47%	4e-34	e-dPHAscl (domaine catalytique de type 1)

Tableau 4 : Résultats des meilleures comparaisons entre toutes les protéines d'Alteromonas sp. et celles des dépolymérases extracellulaires de la base DED (Knoll et al., 2009). Id (identité) ; Pos (positivité). Le type mentionné dans le tableau fait référence à la Figure 13.

La présence dans le génome d'*Alteromonas* sp. des CDS ALSP_2202, ALSP_2657 et ALSP_0697, identifiées comme des dépolymérases extracellulaires (e-dPhaZ) spécifiques des chaînes courtes (SCL), a permis de confirmer que cette souche pouvait utiliser le PHBV comme source de carbone.

L'analyse des CDS ALSP_2657 et ALSP_0697, identifiées comme e-dPhaZ avec un domaine catalytique de type 1 (Jendrosek and Handrick, 2002, Figure 13), a révélé un peptide signal pour les deux protéines confirmant qu'elles sont sûrement sécrétées. De plus, la méthode dbSCAN (Hahsler, Piekenbrock et Doran, 2019) indique que ces deux CDS appartiennent à la famille CE1 CAZy, une famille contenant de nombreuses estérases telles que les PHB dépolymérases (http://www.cazy.org/CE1.html). A la vue de tous ces éléments, ALSP_2657 et ALSP_0697 peuvent être considérées comme deux poly (3-hydroxybutyrate) dépolymérases extracellulaires. L'analyse du contexte génomique de ces protéines n'a révélé aucune autre CDS potentiellement impliquée dans le processus de dégradation. En revanche, la dépolymérase externe ALSP_2202 possède un site catalytique de type 2 (Tableau 4) et est localisée dans une région du génome regroupant plusieurs gènes (de ALSP_2200 à ALSP_2205) probablement impliqués dans la dégradation externe du PHBV (Figure 18).

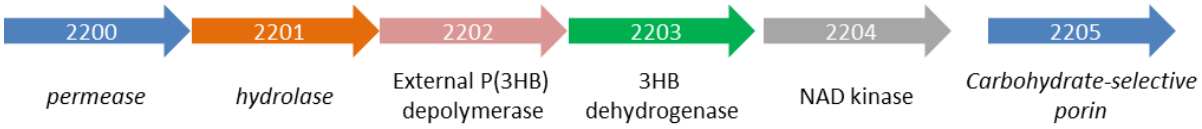


Figure 18 : Représentation schématique du cluster de gènes impliqués dans la dégradation extracellulaire des PHA

Bien que ALSP_2202 ait été identifiée comme une dépolymérase extracellulaire, aucun signal peptidique n'a été détecté dans cette protéine, suggérant qu'elle pourrait ne pas être sécrétée. Cependant, cette protéine peut avoir une voie de sécrétion non classique (Bendtsen *et al.*, 2005 ; Kang et Zhang, 2020). L'analyse d'ALSP_2201 a indiqué que la protéine est ancrée dans la membrane avec la majeure partie de la molécule située à l'extérieur. La présence d'un domaine α/β hydrolase sur cette partie suggère que l'activité hydrolase de la protéine agit à l'extérieur de la cellule. Dans cette région, une perméase (ALSP_2200) et une porine potentiellement sélective pour les glucides (ALSP_2205) ont été identifiées. Une 3-Hydroxybutyrate (3HB) déshydrogénase (qui travaille avec le NAD+) et une NAD+ kinase (impliquée dans la régénération du NAD+) (ALSP_2203 et ALSP_2204 respectivement) complètent cette région. Le scénario que nous pouvons donc proposer est que les dépolymérases extracellulaires (ALSP_2657 et ALSP_0697) couplées à l'hydrolase (ALSP_2201) assurent les premières étapes de dégradation du PHBV, suivant le modèle de *Ralstonia pickettii* T1 proposé par Sugiyama et ses collaborateurs (Sugiyama *et al.*, 2003). Les oligomères ainsi générés sont ensuite internalisés via les perméases (ALSP_2200 et ALSP_2205) et dégradés via la PHB dépolymérase (ALSP_2202) en monomères. Ensuite, ces monomères entrent dans le cycle de β-oxydation via la 3HB déshydrogénase (ALSP_2203) (Shiraki, Endo et Saito, 2006). Pour valider l'implication

de ces gènes dans la dégradation du PHBV, une analyse d'expression différentielle d'*Alteromona* sp. a été réalisée avec du glucose ou du PHBV comme conditions de culture comme source de carbone.

c. Analyse transcriptomique

Pour valider l'implication des gènes décrits ci-dessus dans la dégradation du PHBV, une analyse d'expression différentielle d'*Alteromonas* sp. a été réalisée avec du glucose ou du PHBV comme source de carbone. Une vue générale de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme dans ces conditions est présentée Figure 19.

Avec le PHBV comme source de carbone, le gène identifié comme codant pour la dépolymérase extracellulaire ALSP_2657 est presque 30 fois plus exprimé qu'en condition contrôle (log2 fold-change = 4,89) (Figure 20), indiquant que cette enzyme est bien impliquée dans la biodégradation de ce polymère. En revanche, l'expression de l'autre dépolymérase extracellulaire (ALSP_0697) ne change pas entre les deux conditions de culture, laissant supposer que cette enzyme est soit impliquée plutôt dans la dégradation des PHAmcl que celle de PHAscl comme le PHBV (les dépolymérases étant divisées en deux groupes (SCL- et MCL-PHA dépolymérases) et différant quant à la spécificité de substrat pour les SCL-PHA ou MCL-PHA (Kim 2007)), soit ce n'est pas une PHA dépolymérase. L'hydrolase codée par ALSP_2201 est presque 9 fois plus exprimée sous condition PHBV (log2 fold-change = 3,12) (Figure 20), ce qui semble valider son implication dans le clivage des polymères PHBV. Le processus d'hydrolyse étant peu spécifique (Meereboer, Misra, et Mohanty 2020), des oligomères de poly(R-3-hydroxybutyrate) (PHB) de différentes tailles et des monomères de 3-hydroxybutyrate (3HB) et de 3-hydroxyvalérate (3HV) pourraient être générés. Le PHBV utilisé pour cette expérience étant composé de seulement 3% de HV, la quantité de monomères HV libérée serait relativement faible par rapport à celle des monomères HB.

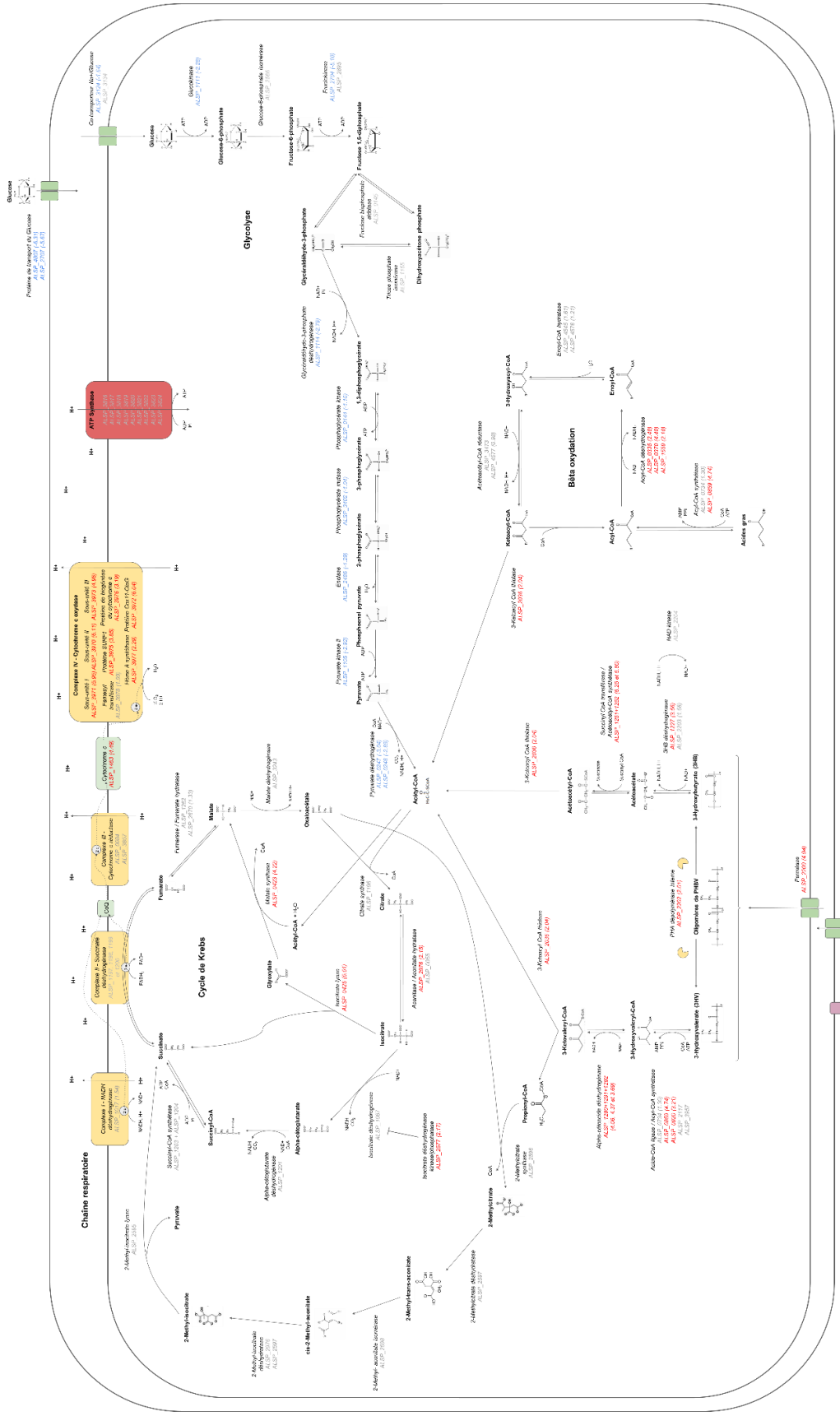


Figure 19 : Vision générale de l'analyse transcriptomique d'Alteromonas sp. En rouge, les séquences codantes surexprimées, et en bleue celles qui sont sous-exprimées en condition d'utilisation du PHBV comme seule source de carbone

La porine codée par ALSP_2205 n'est pas surexprimée en condition PHBV par rapport à la condition contrôle (Figure 20), ce qui peut s'expliquer par le fait que les porines permettent une diffusion passive non spécifique et sont présentes en grand nombre, représentant la majorité des protéines membranaires externes des bactéries Gram-négatives (Jap et Walian, 1996). En revanche, la perméase codée par ALSP_2200 est 30 fois plus exprimée (log2 fold-change = 4,94) (Figure 20), suggérant que ce transporteur cellulaire est spécifique des substrats libérés lors de la biodégradation externe du PHBV. Les porines étant perméables aux solutés hydrophiles de < 600 Da (Jap et Walian, 1996) et les monomères de HB et HV ayant un poids moléculaire de 104 et 117 Da respectivement, on peut envisager que des oligomères composés de jusqu'à 5 monomères puissent être internalisés.

La dépolymérase intracellulaire codée par ALSP_2202 est 4 fois plus exprimée en condition PHBV par rapport à la condition contrôle (log2 fold-change = 2,01) (Figure 20). Cette enzyme est beaucoup moins surexprimée que la dépolymérase externe codée par ALSP_2657, indiquant que la biodégradation du PHBV est un processus qui se déroule principalement dans le milieu extracellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés dans la littérature. En effet, selon la revue de Meereboer et ses collaborateurs, la biodégradation des PHA est principalement réalisée de manière extracellulaire par des enzymes externes (Meereboer, Misra, et Mohanty 2020), ces dernières décomposent des polymères complexes donnant des molécules plus petites à chaînes courtes (oligomères, dimères et monomères) suffisamment petites pour traverser la membrane bactérienne et être utilisées comme source de carbone et d'énergie (Shah et al., 2008). La biodégradation peut également se produire dans les cellules, mais ce processus a lieu principalement pour dépolymériser le PHA intracellulaire (Handrick et al., 2004). Ainsi, *Alteromonas* sp. internalise principalement le 3HB et une petite quantité de monomères de 3HV.

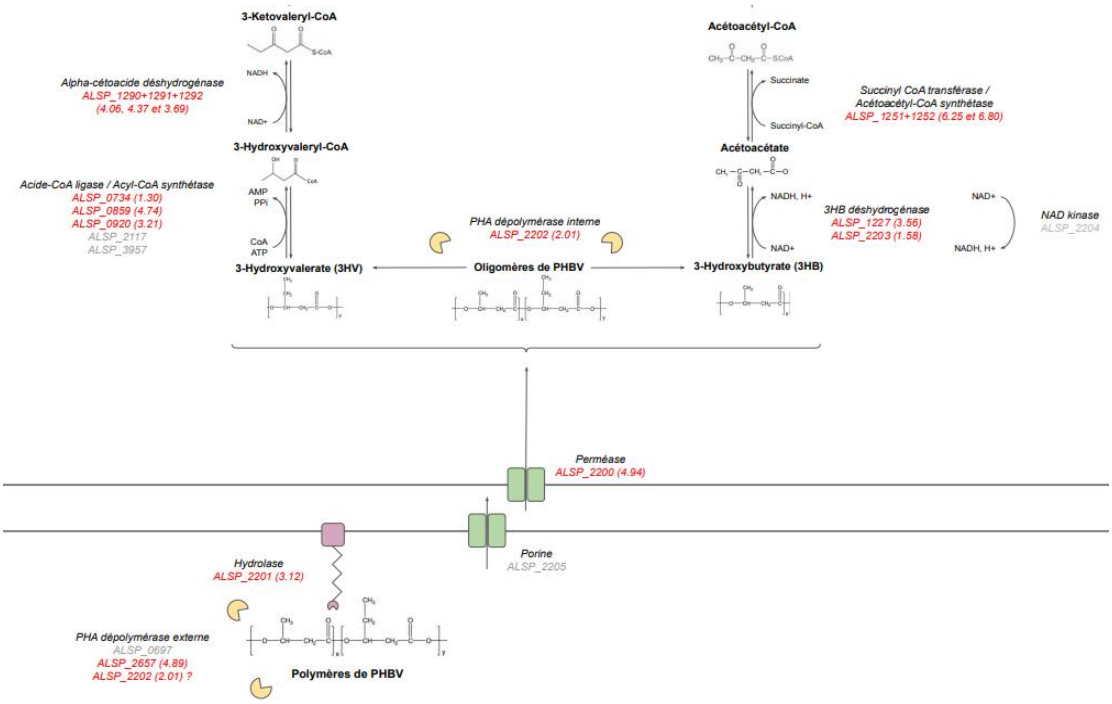


Figure 20 : Biodégradation du PHBV par Alteromonas sp.

Concernant les monomères 3HV, ils seraient assimilés par liaison avec une coenzyme-A grâce à l'action d'une Acyl-CoA synthétase (Figure 20). Cette enzyme non spécifique est codée par au moins cinq gènes présents chez dans le génome d'*Alteromonas* sp. (ALSP_0734, ALSP_0859, ALSP_0920, ALSP_2117 et ALSP_3957), dont trois sont surexprimés sous condition PHBV (ALSP_0734, ALSP_0859 et ALSP_0920 ; log2 fold-change = 1,30, 4,74 et 3,21, respectivement). Le 3-hydroxyvaléryl-CoA produit serait ensuite transformé en 3-cétovaléryl-CoA par l'α-cétoacide déshydrogénase, un complexe composé de protéines codées par trois séquences co-localisées (ALSP_1290, ALSP_1291 et ALSP_1292) et qui sont entre 13 et 24 fois plus exprimées lorsque le PHBV est la source de carbone (log2 fold-change = 4,06, 4,37 et 3,69, respectivement). Ensuite, le 3-cétovaréryl-CoA serait clivé en acétyl-CoA et propionyl-CoA par la 3-cétoacyl-CoA thiolase (ALSP_2036, ; log2 fold-change =.2,04). Le propionyl-CoA serait alors métabolisé par le cycle du citrate de méthyle, une voie parallèle au cycle triacyl carboxylique (TCA) qui conduit à la production de succinate et de pyruvate à partir du propionyl-CoA et de l'oxaloacétate (Brock et al., 2002) (Figure 19). Cette voie en 5 étapes implique quatre enzymes (2-Méthylcitrate synthase, 2-Méthylcitrate déshydratase, 2-Méthyl-aconitate isomérase et 2-Méthyl-isocitrate lyase) codées par le groupe de gènes co-localisés ALSP_2595 à ALSP_2598. L'expression de ces séquences est inchangée en condition PHBV par rapport à la condition glucose, ce qui peut s'expliquer par la faible quantité de HV dans la composition de PHBV.

Les monomères 3HB libérés semblent emprunter la voie métabolique décrite par Senior et Dawes chez *Azotobacter beijerinckii* (Senior et Dawes 1973) et seraient oxydés en acétoacétate par la 3HB déshydrogénase. Deux gènes codant pour cette enzyme sont présents dans le génome d'*Alteromonas* sp. et les deux sont surexprimés lorsque le PHBV est la source de carbone ; ALSP_1227 et ALSP_2203 (log2 fold-change = 3,56 et 1,58, respectivement) (Figure 20). Pour régénérer le NAD+ réduit en NADH par la 3HB déshydrogénase, la NAD kinase codée par ALSP_2204 pourrait intervenir mais son expression ne change pas entre les deux conditions de culture. L'acétoacétate serait alors lié à une coenzyme-A par la succinyl-CoA transférase qui est codée par ALSP_1251 et ALSP_1252, deux séquences co-localisées et très fortement surexprimées sous condition PHBV (log2 fold-change = 6,25 et 6,80, respectivement) (Figure 20). Le produit acétoacétyl-CoA serait donc clivé en deux molécules d'acétyl-CoA par la 3-Ketoacyl-CoA thiolase, une enzyme du cycle de la β-oxydation codée par la séquence ALSP_2036 qui est 4 fois plus exprimée en condition PHBV qu'en condition glucose (log2 fold-change = 2,04) (Figure 19 et 21). Cette voie de dégradation des acides gras fait intervenir des enzymes codées par le régulon *fad* responsables du clivage des acides gras en acétyl-CoA (Fujita, Matsuoka, et Hirooka 2007). Les protéines impliquées (Acyl-CoA synthétase, ALSP_0734 et ALSP_0859 ; Acyl-CoA déshydrogénase, ALSP_0335, ALSP_0370 et ALSP_1559 ; Enoyl-CoA hydratase, ALSP_4545 et ALSP_4576) sont également surexprimées en condition PHBV par rapport à la condition contrôle (log2 fold-change = 1.30, 4.74, 2.40, 4.40, 2.10, 1.61 et 1.21, respectivement), ce qui permet à la bactérie de générer des porteurs d'électrons sous forme réduite (NADH et FADH2) et de produire de l'acétyl-CoA à partir des acides gras (Figure 21).

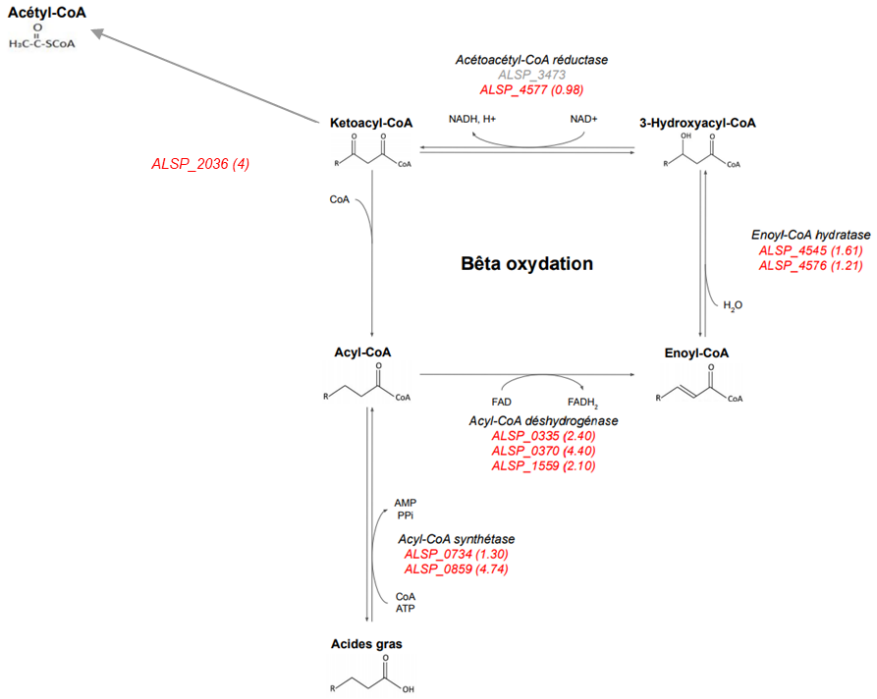


Figure 21 : Activation de la voie de la β-oxydation en condition PHBV permettant de cliver les acides gras en acétyl-CoA et de générer des porteurs d'électrons sous forme réduite.

L'acétyl-CoA produit à partir de la biodégradation et de la métabolisation du PHBV et de la dégradation des acides gras alimente le cycle du TCA mais l'analyse de l'expression différentielle entre les deux conditions de culture montre que l'expression de la plupart des enzymes impliquées dans le cycle du TCA ne change pas sous la condition du PHBV par rapport à la condition témoin (Figure 22). En revanche, les deux enzymes du shunt glyoxylate (GS), l'isocitrate lyase et la malate synthase, sont toutes deux fortement surexprimées (ALSP_0425 et ALSP_0423, log2 fold-change = 5,51 et 4,22, respectivement). De même, l'enzyme régulatrice Isocitrate déshydrogénase kinase/phosphatase codée par ALSP_2577 est également surexprimée sous condition PHBV (log2 fold-change = 2,17), cette dernière inhibe l'enzyme TCA Isocitrate déshydrogénase par phosphorylation (Laporte, Stueland, et Ikeda 1989) pour favoriser l'Isocitrate lyase et la GS. Ainsi, l'acétyl-CoA est plus impliqué dans l'approvisionnement du cycle GS que dans celui du cycle TCA. Lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une source de carbone très assimilable comme le glucose, il est avantageux de faire passer leur flux de carbone à travers un cycle complet de TCA. En effet, ces réactions sont les plus efficaces pour récupérer l'énergie des sources de carbone et régénérer les porteurs d'électrons réduits (de la Peña Mattozzi, Kang, et Keasling 2010). En condition PHBV, l'utilisation préférentielle du cycle GS plutôt que du cycle TCA complet peut s'expliquer par le fait que ce by-pass évite la perte des carbones sous forme de CO2, évitant les étapes de décarboxylation du cycle TCA (Dolan et Welch 2018), au détriment de production d'énergie (de la Peña Mattozzi, Kang, et Keasling 2010). De plus, le GS est essentiel lorsque les bactéries sont cultivées avec des sources de carbone qui entrent dans le métabolisme exclusivement sous forme d'acétyl-CoA (Laporte, Stueland, et Ikeda 1989), ce qui est le cas

pour le PHBV. Cependant, le GS contourne les étapes de production de porteurs d'électrons du cycle TCA, en particulier la production de NADH, qui sont nécessaires au sein de la chaîne de transport d'électrons dans la production d'ATP (Koedooder et al., 2018). Néanmoins, ce phénomène peut être compensé par une production accrue de NADH et de FADH2 grâce à la stimulation du cycle de β-oxydation sous condition PHBV (Sandhir 2014).

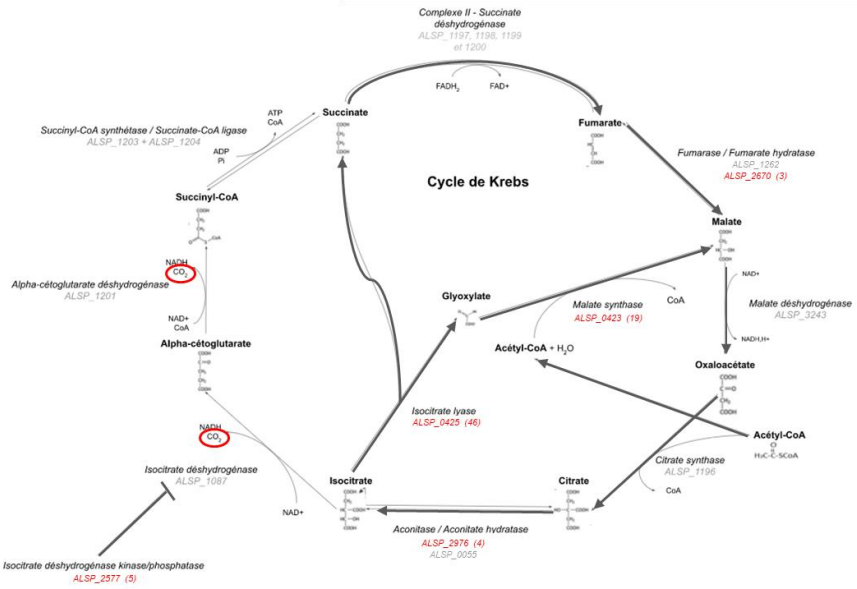


Figure 22 : Cycle de Krebs et shunt du Glyoxylate. Alteromonas sp. Semble préférentiellement utiliser le shunt du glyoxylate lors de l'assimilation du PHBV comme source de carbone.

Les porteurs d'électrons réduits sont oxydés par les complexes de la chaîne respiratoire membranaire. L'expression des trois premiers complexes ne change pas entre les deux conditions de culture (Figure 19). En revanche, le complexe IV correspondant à la cytochrome c oxydase est composé de plusieurs sous-unités qui sont codées par un groupe de gènes co-localisés fortement surexprimés lorsque le PHBV est la source de carbone (ALSP_3970 à ALSP_3978, log2 fold-change de 6,11 à 1,99). Les procaryotes sont capables de répondre aux changements environnementaux en induisant des composants respiratoires particuliers à la demande (Ludwig 1987). La surexpression de la cytochrome c oxydase stimule le pompage des protons du cytoplasme vers le périplasme et génère ainsi un gradient électrochimique élevé. Cette dernière est utilisée pour le fonctionnement de l'ATP synthase, formée de nombreuses sous-unités codées par le groupe de gènes co-localisés de ALSP_3816 à ALSP_3824. Leur expression ne change pas sous condition PHBV par rapport à la condition glucose, indiquant que toutes les voies métaboliques mises en place en amont par *Alteromonas* sp. lorsque le PHBV est la source de carbone, sont suffisantes pour assurer la fonction d'ATP synthase et une production d'énergie cellulaire adéquate.

Enfin, la plupart des enzymes impliquées dans la voie de la glycolyse sont sous-exprimées en condition PHBV par rapport à la condition contrôle avec glucose, ainsi que les transporteurs spécifiques de ce

monosaccharide (ALSP_2707 et ALSP_4807, log2 fold-change = -5,65 et -6,31, respectivement) (Figure 19). Ce résultat semble logique puisque les bactéries ne dépenseront pas d'énergie pour traduire et transcrire des protéines qui ne sont pas utiles dans les conditions de culture dans lesquelles elles se développent.

d. Conclusion

Lors de ce travail, nous avons isolé une nouvelle souche marine d'un consortium microbien dégradant le Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV). Cette souche a été affiliée au genre Alteromonas et a été nommée *Alteromonas* sp. Différents paramètres biologique et physico-chimiques ont été effectués pour confirmer la capacité de cette souche à dégrader le PHBV. De plus, le séquençage du génome de cette souche révèle trois protéines potentiellement impliquées dans la dépolymérisation externe, dont deux sont isolées dans le génome (ALSP_2657 et ALSP_0697). Ces deux dépolymérases ont toutes les caractéristiques pour être sécrétées et impliquées dans le catabolisme des glucides. Concernant la troisième dépolymérase externe (ALSP_2202), aucun peptide signal n'a été détecté. Cette dernière protéine est localisée dans un cluster de gènes potentiellement impliqués dans la dégradation des PHA. L'analyse de l'expression différentielle des gènes utilisant le PHBV comme unique source de carbonne va révèler finalement que ALSP_0697 n'est pas surexprimée dans ces conditions. Grâce aux transcriptomes, nous avons pû retracer tout le cheminement du PHBV au sein de la cellule et mis en lumière tous les gènes impliqués. L'utilisation du shunt du glyoxylate n'était pas attendu mais permet à la cellule d'éviter une décarboxylation en la faveur de la production de biomasse.

L'ensemble de cette étude est en cours de valorisation par l'écriture d'un article. Les résultats présentés correspondent, à notre connaissance, à la première étude complète de biodégradation d'un polymère qui s'étend des tests de dégradation jusqu'aux analyses de génomique/transcriptomique qui les valident. Lors de ce travail, l'ensemble des données des paramètres biologiques et physico-chimique a été analysé par la thésarde que j'ai co-encadrée, Justine Jacquin, tandis que je me suis préférentiellement attelée à l'annotation fonctionnelle des gènes impliqués dans la biodégradation. L'analyse de l'expression différentielle a été réalisée par Adèle Wolinski, étudiante en M2, en suivant mes consignes et mes recommandations. Ce manuscrit, dont je dirige la rédaction et dont je serai la dernière auteure est, pour l'instant, co-écrit par Adèle Wolinski, Justine Jacquin et moi-même.

3. De l'identification à l'activité enzymatique

Lors de l'exploration du génome d'*Alteromonas* sp., la prédiction fonctionnellle en tant que dépolymérase externe de la CDS ALSP_2657 a été confirmée par l'analyse du transcriptome du génome lorsque du PHBV est utilisé comme source de carbone. Afin d'aller plus loin dans l'analyse de cette protéine, des premieres expérimentations de dégradation *in vitro* ont été réalisées par Gabrielle Derippe, étudiante en thèse que je co-encadre. Nous avons identifé à partir de la littérature, deux dépolymérases du PHB, P12625 et P94146, référencées dans la base de données UniProtKB (https://www.uniprot.org/) et isolées respectivement de *Alcaligenes faecalis* T1 (renommée *Ralstonia pickettii* ou *Burkholderia pickettii*) (Shirakura *et al.*, 1986) et *Alcaligenes faecalis* AE122 (Kita *et al.,* 1997). Ces deux enzymes ont servi de témoins dans notre expérimentation. Les enzymes P12625, P94146 ainsi que ALSP_2657, ont été produites et purifiées par le Laboratoire de Génomique et Biochimie du Métabolisme (Genoscope/LGBM). Pour se faire, les gènes codant pour ces enzymes ont été amplifiés à partir de l'ADN génomique ou directement synthétisé. Ils ont ensuite été clonés dans un vecteur d'expression qui a été introduit dans une souche d'*Escherichia coli* pour surexprimer la protéine pendant la culture. Après purification de chacune des protéines, en se basant sur les travaux présentés dans trois articles (Shirakuma *et al.*, 1986 ; Mukai *et al*, 1993a et Morohoshi *et al.*, 2020), nous avons observé l'activité catalytique des enzymes par la décroissance de la turbidité de granules de PHBV en solution par un suivi de DO à 650nm. Les conditions en termes de tampon et de température préconisés par Shirakuma et ses collaborateurs (Shirakuma *et al.*, 1986) ont été appliquées dans un premier temps pour les trois enzymes. Une modification de tampon a dû être apportée pour ALSP_2657 dont aucune décroissance de l'absorbance n'avait été observée avec le tampon de la publication de Shirakuma et ses collaborateurs. Les résultats préliminaires de biodégradation *in vitro* obtenus avec les trois enzymes sont présentés dans la Figure 23.

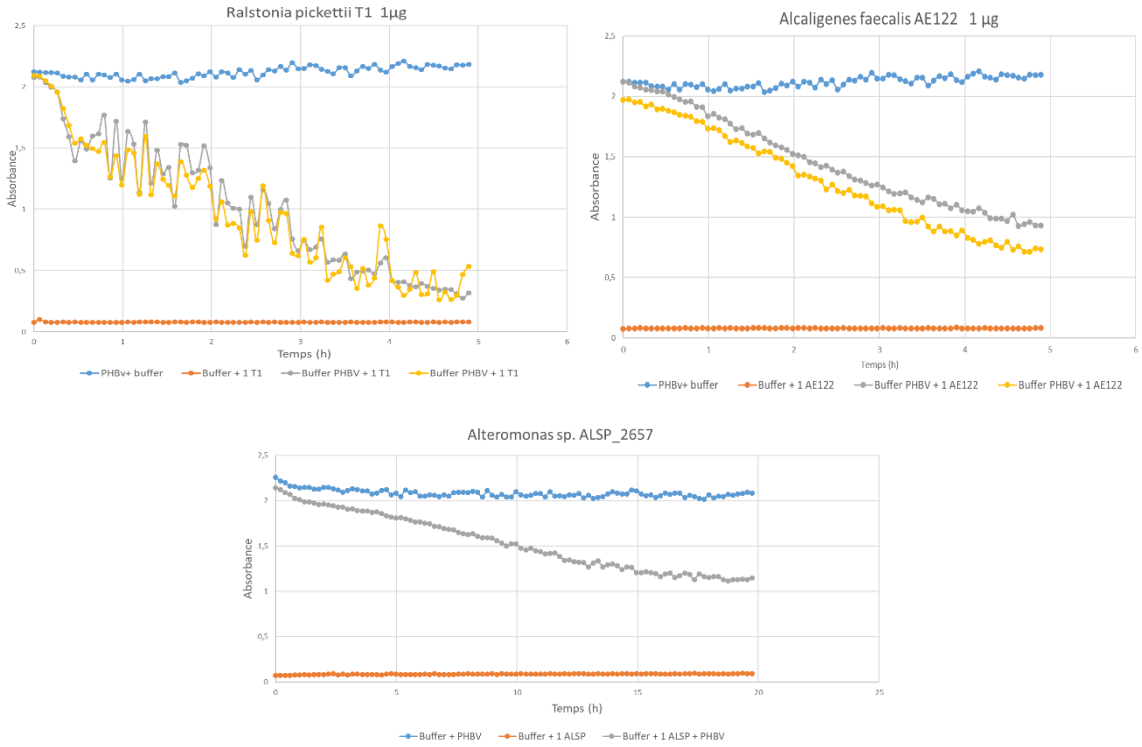


Figure 23 : Suivi en fonction du temps de l'activité enzymatique des dépolymérases extracellulaires de Ralstonia pickettii T1, Alcaligenes faecalis AE122 et Alteromonas sp.

Des tests d'optimisation de l'activité enzymatique de ALSP_2657, axés sur le tampon et la température de réaction, sont en cours de réalisation afin de trouver des conditions plus optimales pour la dépolymérase ALSP_2657 d'*Alteromonas* sp.

4. A chaque polymère ses dégradeurs ?

Le postulat fait, est que les dégradeurs recrutés lors de la colonisation sont spécifiques de la nature du polymère contrairement au reste de la plastisphère. L'identification de ces différents dégradeurs s'effectue après immersion, pendant plusieurs mois dans le port de Banyuls-sur-Mer (42°29'300 N – 03°08'700 E, France), de polymères ayant des compositions différentes. Les caractéristiques des polymères testés sont résumées dans le Tableau 5.

Nom du PHA	Composition	Cristallinité	Aspect initial	Aspect après immersion	Dégradation
PHB	100% HB	++++	Papier de soie blanc	NA	+++
PHBHHx94	94% HB 6% HHx	+++	Lamelles transparentes et rigides	Lamelles transparentes et rigides	-
PHBV89	89% HB 11% HV	++	Lamelles transparentes et rigides	Lamelles transparentes et rigides	-
PHBV95	95% HB 5% HV	+++	Lamelles blanches opaques et rigides	Lamelles blanches opaques et rigides	-
PHOHHx	92% HO 8% HHx	+	Transparent rigide	Transparent et gélatineux	++
PHOHHp	60% HO 40% HHp	+	Transparent et collant	Souples et collants	+
PHO	89% HO 5.5% HHX 5.5% HD	+	souple	En cours	En cours
PHHp	95% HHp 4.4% HD 0.6% HV	-	Collant/ Elastique	En cours	En cours
PHN Δac	58.1% HN 24% HD 14% HHp 4% HO	-	souple	En cours	En cours
PHN ac	74% HN 23% HHp 2%HD	-	souple	En cours	En cours

Tableau 5 : Caractéristiques des différents types de plastiques PHA utilisés lors de l'expérience (HB, hydroxybutyrate ; HHx, hydroxyhexanoate ; HV, hydroxyvalerate ; HO, hydroxyoctanoate ; HHp, hydroxyheptanoate). Dans la production de PHNac, il a été ajouté de l'acide acrylique (inhibiteur beta-oxidation) au substrat afin de se rapprocher d'un homopolymère en HN. Non applicable. Polymères fournis par Stéphane Bruzaud, IRDL, Lorient.

Le premier lot de polymères a été immergé d'octobre 2020 à avril 2021. Le PHB a été utilisé comme témoin. Comme attendu, ce polymère a été totalement dégradé après les 6 mois d'immersion (Meereboer, Misra, and Mohanty, 2020). En revanche, les polymères composés d'une très grande majorité de PHB (PHBV95, PHBHHx94 et PHBV89), ne présentaient pas de signes visibles de biodégradation. L'introduction de HV et de HHx dans le PHB aboutit à la formation d'un copolymère dont la région amorphe est plus importante que celle du PHB seul, ce qui devrait le rendre plus sensible à l'attaque enzymatique et donc à la biodégradation (Jendrossek, Schirmer, and Schlegel 1996 ; Meereboer, Misra, and Mohanty, 2020), mais contre toute attente les PHA dépolymérases sont plus efficaces sur le PHB que sur le PHBV (Meereboer, Misra, and Mohanty, 2020). Le taux de biodégradation diminue d'autant plus que la chaîne latérale des unités monomériques est longue, celle-ci empêchant la diffusion des dépolymérases (Li *et al.,* 2007). Ainsi, dans le cas de ces 3 copolymères, les monomères de HV et de HHx qui présentent une chaîne latérale plus

longue que celle du HB, limite l'accès des dépolymérases aux sites de clivage des copolymères ce qui explique leur plus faible biodégradation par rapport au PHB. L'épaisseur des lamelles utilisées est aussi un des facteurs limitant la dégradation enzymatique de ces PHAs (Li *et al.,* 2007). Quant aux copolymères plus amorphes composés uniquement de mcl, PHOHHx et PHOHHp, ils semblaient être plus dégradés que les PHAs plus cristallins comme cela était attendu (Jendrossek, Schirmer, and Schlegel, 1996).

Après détachement des cellules des biofilms (appelés consortia) des polymères, le test de biodégradation basé sur la présence d'un halo de dégradation (Jendrossek, Schirmer, and Schlegel, 1996), a été réalisé après dépôt d'un aliquote de chaque consortium sur un milieu gélosé contenant du PHBV en poudre comme unique source de carbone (Figure 12). Les cellules de ceux répondant positivement à ce test ont été étalées sur un milieu riche et les clones isolés ont à leur tour été testés pour leur capacité à dégrader le PHBV.

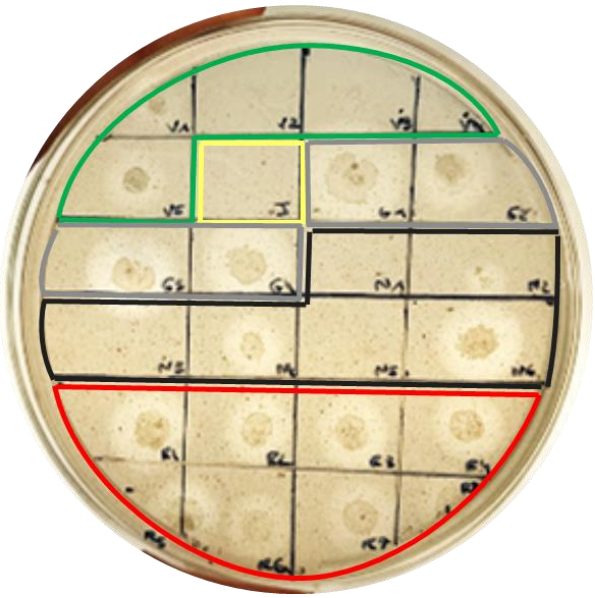


Figure 24 : Développement des communautés bactériennes et formation des halos de dégradation à partir des inoculums issus des différents types de PHA cultivés sur une boite gélosée de milieu minimum contenant du PHBV (Vert, PHBHHx94 ; Jaune, PHOHHx ; Gris, PHBV89 ; Noir, PHOHHp ; Rouge, PHBV95)

Les halos de dégradation ont été obtenus pour l'ensemble des copolymères contenant du PHB ainsi que pour les échantillons issus du PHOHHp. Cette dernière observation tend à montrer que parmi ce consortium, une (des) souche(s) est (sont) capable(s) de dégrader des scl. En revanche, l'inoculum du PHOHHx est resté inerte. Dans le cadre de l'isolement de souches, à ce jour, seules des colonies isolées issues du consortium PHBV89 ont développé un halo de dégradation. L'identification taxonomique de ces souches a révélé leur appartenance à des taxons non identifiés jusqu'alors comme intervenant dans la biodégradation des polyhydroxyalcanoates. Les expérimentations d'isolement de souches se poursuivent

pour les autres polymères. L'ensemble de ce travail a été réalisé, sous ma direction, par Adèle Wolinski et Adèle Luthi-Maire, étudiante de M1.

V. Projet de recherche : De la colonisation aux processus de dégradation des plastiques en milieu marin

1. Contexte du projet de recherche

Le projet que je propose se place dans le contexte de la recherche de solutions alternatives aux plastiques conventionnels, qui sont responsables d'une pollution émergente et représentent un enjeu environnemental majeur. De nouveaux plastiques non conventionnels sont actuellement conçus et il est nécessaire de s'assurer avant leur utilisation de leur faible impact sur l'environnement et de leur capacité à être biodégradés. Ainsi, ce projet a pour objectif de préciser le comportement de ces plastiques en milieu marin, de comprendre les mécanismes de biodégradation médiés par les bactéries et de proposer *in fine* des procédés améliorés de biodégradation, basés sur les enzymes impliquées. Ce projet, avec des ambitions à court, moyen et long termes, s'intègre dans la suite des travaux que je suis en train de mener et qui vous ont été présentés précédemment.

Les études présentées dans le chapitre IV « La biodégradation des polyhydroxyalcanoates (PHA) » ont permis de mieux comprendre la biodégradation des PHA non seulement à partir de souches pures en laboratoire, mais aussi à partir de communautés complexes en conditions naturelles marines. En utilisant le metabarcoding de l'ADNr16S, la caractérisation de la plastisphère a permis (i) de confirmer l'originalité de cet environnement par rapport aux microorganismes libres ou attachés aux particules organiques comme cela avait déjà été décrit (Dussud *et al.,* 2018a ; Catao *et al.*, 2019 ; Lambert *et al.*, 2019 ; Planes *et al.* 2019), (ii) de mettre en évidence que les communautés microbiennes sont spécifiques de plusieurs plastiques biodégradables susceptibles d'être utilisés comme des substituts aux plastiques conventionnels et (iii) de caractériser leur activité de biodégradation par des approches pluridisciplinaires. Cependant, si l'utilisation du meta-barcoding de l'ADNr 16S permet d'identifier les communautés microbiennes naturelles associées à la dégradation de ces matériaux, elle ne permet pas de déterminer le rôle de chacune des espèces qui composent ces communautés dans le processus de dégradation, ni d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Une réponse à ces questions peut être apportée par des approches de métagénomiques couplées à un marquage isotopique du matériel à tester (DNA stable isotope probing ou DNA-SIP, (Dumont et Murell, 2005)). Ce type d'approches reste couteux mais est extrêmement sensible pour accéder au lien diversité - fonction des communautés naturelles. Par exemple, des précédents travaux ont utilisé le DNA-SIP couplé au metabarcoding (DNA-SIP-MetaB) pour caractériser les espèces capables de dégrader des polluants organiques persistants (Sauret *et al.* 2013, Sauret *et al.*,2014). Dans le cas d'un couplage DNA-SIP et métagénomique (DNA-SIP-MetaG), une méthode extrêmement puissante (Singer, Wagner et Woyke, 2017 ; Altshuler *et al.*, 2022), la portée des résultats peut toutefois être limitée par les fonctions parfois inconnues dans les bases de données fonctionnelles (par exemple les données COG

(Clusters of Orthologous Genes) et PFAM (Protein families) des bases de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Une approche de méta-transcriptomique (metaT) peut être un complément pertinent, mais les molécules d'ARN sont moins stables que l'ADN génomique, ce qui amène des problèmes de reproductibilité en plus des contraintes analytiques lourdes et couteuses inhérentes à cette approche (Ammon *et al.*, 2019 ; Cristescu, 2019). En complément de ces approches environnementales, il peut être utile de développer une approche culturale. Dans ce cas, les gènes exprimés par des souches pures isolées en laboratoire lors de la biodégradation du plastique d'intérêt sont identifiés par des outils de génomique et de transcriptomique, et les voies métaboliques impliquées peuvent être reconstruites.

L'étude proposée sera, dans un premier temps, le couplage entre une approche culturale (génomique, transcriptomique) et des communautés complexes (DNA-SIP-MetaG) pour identifier les enzymes clés qui interviennent dans les processus de la dépolymérisation à l'assimilation/minéralisation des plastiques incluant des tests de dégradation *in vitro* pour les dépolymérases identifiées. Cette strategie fournira des données de génomique fonctionnelle environnementale originales qui permettront de mieux comprendre les processus de biodégradation en mileu marin et d'identifier des enzymes potentiellement impliquées dans ces processus. Les polymères qui seront utilisés seront tout d'abord des PHAs ayant des propriétés différentes afin d'établir une preuve de concept à partir de polymères biosourcés et biodégradables. Dans un second temps, des polymères tels que le polyéthylène vieilli (OXO) seront testés afin de mettre en évidence, entre autres, les enzymes intervenant dans les premières étapes de la dépolymérisation du plastique. En effet, bien que différentes espèces bactériennes aient été identifiées pour leur capacité à biodégrader des polymères pétro et bio-sourcés (revue de Jacquin et al., 2019), aucun des mécanismes moléculaires proposés de la biodégradation des polymères n'a été validé expérimentalement. La seule étude fonctionnelle de la dégradation d'un polymère est celle présentée par Gravouill *et al.* sur le polyéthylène (Gravouil et al., 2017), mais sans mettre en évidence l'enzyme clé de la dégradation. En parallèle de ces axes d'investigation, l'évolution de la plastisphère sera analysée, sur du long terme, par une approche de MetaB, afin de connecter les données (méta)génomiques et de métabarcodes, de les comparer avec des données environnementales, et potentiellement de mettre en évidence une mise en place progressive des biodégradeurs.

2. Déroulement du projet

Ce projet se déroulera en plusieurs étapes (décrites ci-dessous) et sera multidisciplinaires (écologie, microbiologie, (bio)chimie, génomique…). Pour le mettre en œuvre, je travaillerai avec des laboratoires avec lesquels j'ai l'habitude de collaborer et qui sont renommés dans leur domaine. L'organisation générale du projet est présentée Figure 25.

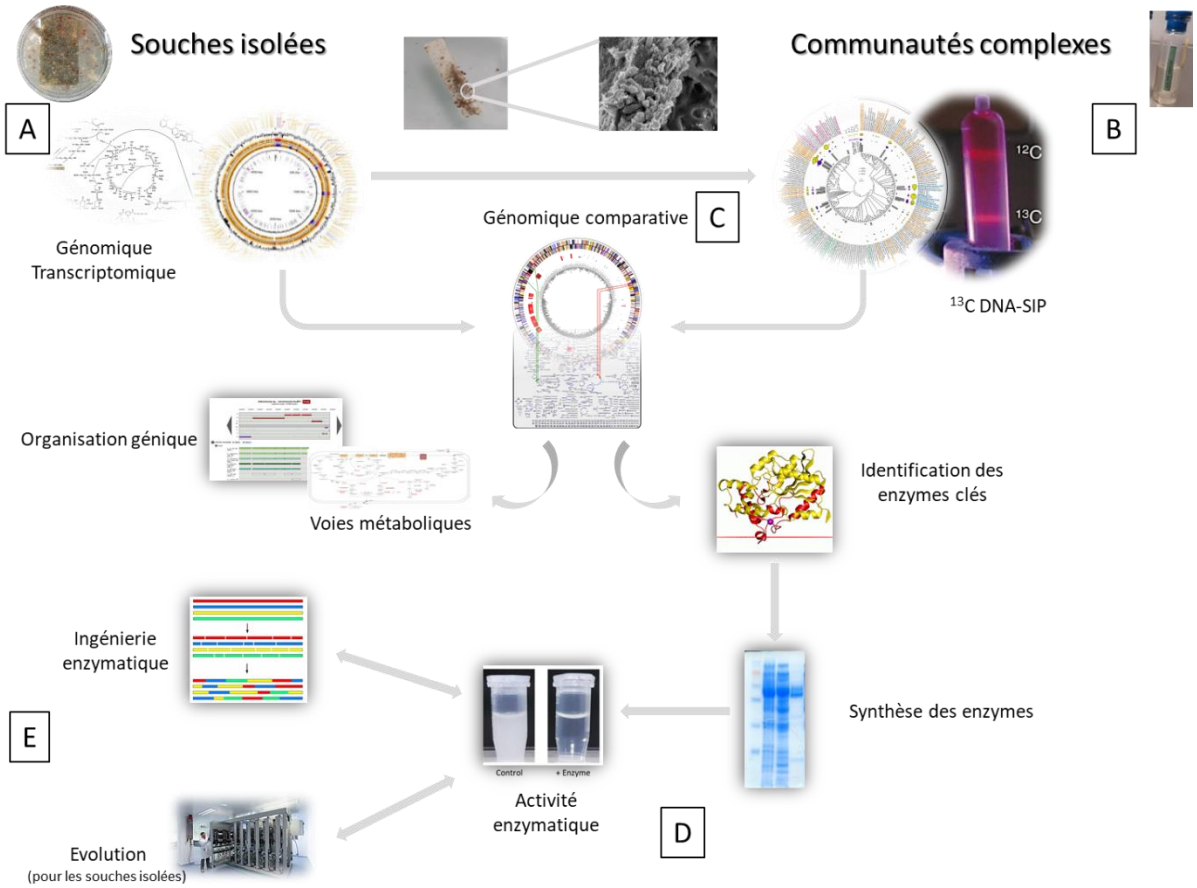


Figure 25 : Vue d'ensemble du déroulement du projet de recherche proposé « De la colonisation aux processus de dégradation des plastiques en milieu marin ».

A. Isolement de souches intervenant dans la biodégradation des polymères.

Collaborateurs : Jean-François Ghiglione (CNRS/LOMIC[1]), Stéphane Bruzaud (IRDL[2]) et le Genoscope (LABGEM[3], LS[4], LIS[5])

Les polymères d'intérêt seront immergés pendant plusieurs mois dans le port de Banyuls sur mer (42°29'300 N – 03°08'700 E, France) comme cela a déjà été décrit précédemment. La plastisphère sera détachée des plastiques et utilisée pour l'isolement de souches cultivables. Dans le but d'explorer le potentiel de cette approche, j'ai déjà isolé une dizaine de souches bactériennes marines taxonomiquement différentes et capables de dégrader divers PHBV comme seule source de carbone. A ce jour, j'ai focalisé mon attention sur un seul isolat qui est une nouvelle espèce non décrite du genre *Alteromonas* sp.. Le séquençage complet du génome et du transcriptome de cette souche en condition de culture en glucose ou en PHBV comme source de carbone ont été réalisés et analysés, comme cela a été décrit précédemment.

Le séquençage complet du génome des autres souches déjà isolées sera réalisé, tout comme pour *Alteromonas* sp., en compilant des données issues de deux technologies de séquençage différentes : Oxford

Nanopore Technology (ONT) et Illumina. Pour rappel, la première permet d'obtenir des lectures de très longues tailles (de l'ordre de plusieurs kb voire de dizaines de kb) intervenant dans l'intégrité du génome en apportant une structure pour l'assemblage couvrant les régions répétées, tandis que la deuxième génère des lectures de petites tailles (de l'ordre d'une centaine de nucléotides) qui permet d'obtenir une séquence de qualité. Il est prévu de séquencer chaque génome à des profondeurs de 100X en ONT et 100X (en 2*150 nt) en Illumina, stratégie classiquement utilisée au Génoscope pour obtenir des génomes bactériens entièrement assemblés et de haute qualité. L'assemblage des données des génomes de chaque souche sera intégré dans la plateforme Microscope (Vallenet *et al.*, 2006 ; Vallenet *et al.,* 2017). Les contenus géniques des génomes seront ensuite analysés et les 5 génomes les plus intéressants en termes de diversité et d'organisation géniques seront choisis pour l'analyse transcriptionnelle. Tout comme pour *Alteromonas* sp. l'ARNm des 5 souches sélectionnées sera extrait, suivant la procédure décrite par Sauret et ses collaborateurs (Sauret *et al.*,2016), après culture en milieu minimum marin artificiel contenant soit du glucose à 20mM (condition témoin), soit du PHBV comme seule source de carbone. Chaque condition de culture sera réalisée en triplicats. Les ARNs seront séquencés en Illumina (en 2*150 nt) et les données de transcriptomiques seront analysées, après alignement des lectures sur le génome complet via le pipeline implémenté dans la plateforme Microscope.

La difficulté de cette étape concerne essentiellement les conditions et le temps de culture. Le PHBV est commercialisé en poudre et peut facilement être ajouté dans une gélose de milieu minimum marin. Les PHAmcl et les OXO se trouvent sous forme de films et ne peuvent pas être broyés en poudre, lié à leurs propriétés. Des tests de pousse cellulaire sur un milieu minimum marin gélosé avec des pastilles de polymères comme seule source de carbone sont en cours. Par ailleurs, le temps nécessaire pour obtenir des preuves de dégradation peuvent être très longs (jusqu'à plusieurs mois). Les paramètres physico-chimiques tels que la respirométrie, la microscopie électronique et la perte de masse sont des paramètres majeurs pour le suivi de la biodégradabilité des souches isolées de ces plastiques.

B. Recherche de biodégradeurs par ^{13}C DNA-SIP

Collaborateurs : Jean-François Ghiglione (CNRS/LOMIC[1]), Stéphane Bruzaud (IRDL[2]) et le Genoscope (LS[4], LIS[5])

La méthode de ^{13}C DNA-SIP couplée à une analyse métagénomique de la communauté, permet de révéler les liens entre la diversité microbienne et la fonction des populations microbiennes sans passer par une étape de mise en culture et ainsi mieux comprendre les relations qui existent entre les dégradeurs et la population qui bénéficie de cette dégradation (appelées « opportunistes ») au sein de la plastisphère. Brièvement, cette technique repose sur le marquage au ^{13}C d'un polymère qui est incubé avec une communauté microbienne provenant d'un biofilm mature issu d'une colonisation du même polymère mais non marqué (^{12}C). Après inoculation pendant plusieurs jours/mois dans des aquariums en circuit ouvert sur

la baie de Banyuls sur mer, la communauté microbienne est détachée des polymères et l'ADN est extrait selon le protocole déjà décrit. Plusieurs points de prélèvement sont effectués et en parallèle l'ensemble des paramètres (production bactérienne, consommation d'oxygène, masse, nutriments) sont suivis afin de choisir le temps de prélèvement le plus adéquat pour les analyses. L'ADN extrait est fractionné en gradient de Chlorure de césium suivant sa densité (Dunford et Neufeld, 2010). On obtient deux fractions : la fraction lourde correspondant à l'ADN ayant incorporé du ^{13}C, c'est à dire l'ADN des organismes qui ont métabolisé le polymère marqué, et la fraction légère, qui correspond à l'ADN des opportunistes (Figure 26).

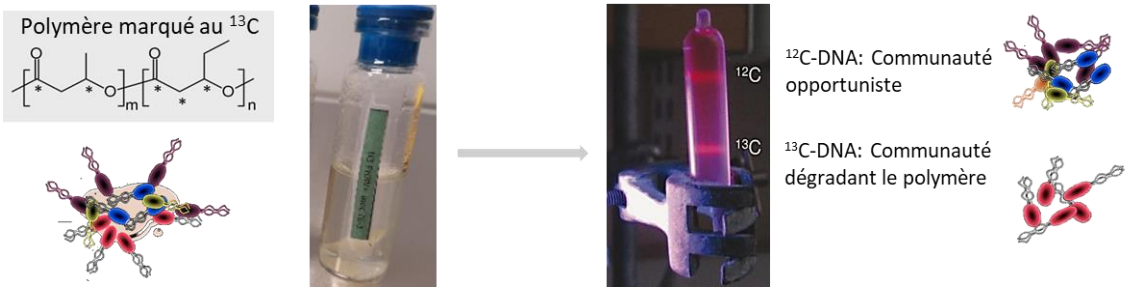


Figure 26 : Schéma expérimental de l'expérience DNA-SIP permettant de différentier les biodégradeurs (fraction lourde) des opportunistes (fraction légère).

Une première expérience de ^{13}C DNA-SIP-MetaG, en utilisant du PHBV avec 3% de valérate comme source de carbone, a déjà été réalisée pendant la thèse de Justine Jacquin. L'analyse de la communauté naturelle complexe par le pipeline bioinformatique SqueezeMeta (Tamames et Puente-Sánchez, 2019) a permis de reconstruire des MAG (Metagenome-Assembled Genome).de dégradeurs. L'exploration de ces génomes, par les deux stagiaires de M2 (Safa Habichy et Florent Poubanne) que j'encadre, est en cours. Les résultats, déjà encourangeants, permettront de compléter notre connaissance sur le processus de biodégradation, notamment au sein d'une communauté naturelle complexe.

L'une des difficultés de cette approche est que, comme indiqué précédemment, la technique du ^{13}C DNA-SIP est une technique coûteuse. Cependant, dans le cadre d'une collaboration avec les polymeristes de l'IRDL, qui ont développé la capacité de produire sur mesure des polymères marqués au ^{13}C, le prix de ces polymères a été considérablement réduit et ouvre des perspectives sur l'éventail des plastiques à étudier. Il n'en reste pas moins que le temps idéal de prélèvement est, en fonction des polymères étudiés, un point délicat et que le suivi des paramètres de biodégradation est essentiel.

C. *Génomique comparative : Organisation génique, voies métaboliques, identification des enzymes.*

Collaborateurs : Genoscope (LABGEM[3])

L'exploration du génome d'*Alteromonas* sp. m'a permis pour l'instant de mettre en évidence la présence de plusieurs dépolymérases extracellulaires (dont une exprimée différentiellement en condition de culture PHBV), ainsi que d'autres gènes intervenant potentiellement dans le processus de biodégradation. L'analyse comparative des génomes nous permettra de savoir si le contenu génique, et potentiellement cette organisation, sont conservés chez les biodégradeurs. La voie de biodégradation a été complétement reconstruite pour *Alteromonas* sp. Nous pouvons nous poser la question de savoir si cette voie sera la même en fonction de la composition des polymères ou si la cellule engage d'autres voies métaboliques plus orientées dans la dégradation des lipides comme cela peut être attendu pour les PHAmcl ou le PE ? Ces données obtenues par l'approche de génomique/transcriptomique pourront être mises en regard avec les résultats obtenus au niveau des communautés naturelles. Nous pourrons savoir si les familles/genres/espèces obtenus par l'approche culturale seront les mêmes que celles/ceux identifié(e)s dans la fraction lourde dans les expériences de DNA-SIP et quelles seront les fonctions les plus présentes dans cette communauté. A partir de nos connaissances sur les souches isolées, nous pourrons identifier et étudier les enzymes clés impliquées dans la biodégradation.

Les analyses de génomique comparatives seront réalisées à l'aide de la plateforme Microscope qui offre un panel d'outil dédiés à l'analyse des génomes procaryotes. Concernant les PHAs, les enzymes clés de dépolymérisation sont des carboxylestérases appartenant à la famille des α/β hydrolases (Jendrossek et Handrick 2002). Un grand nombre de dépolymérases ont été recensées dans « The PHA Depolymerase Engineering Database » (Knoll et al. 2009, http: //www.ded.uni -stuttgart.de/). Pour identifier les dépolymérases externes, qu'elles proviennent des analyses culturales ou des communautés, nous utiliserons cette base de données pour des recherches d'homologie de séquences ainsi que des informations issues des bases de données PFAM (http://pfam.xfam.org/, Mistry *et al.*, 2021) et CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes, http://www.cazy.org/), plus axées respectivement sur des domaines/familles de protéines et de la structure d'enzymes intervenant au niveau des liaisons glycosidiques.

Lors de cette étude, de nouvelles dépolymérases (pour les PHA) vont très probablement être mises en évidence. Les sites actifs du domaine catalytique des PHA dépolymérases sont très conservés contrairement au reste de la séquence. De ce fait, l'identification de ces enzymes permettra d'une part de compléter la base de données DED (dont la dernière mise à jour date de 2005 (Knoll *et al.,* 2009) et parmi lesquelles peu d'enzymes issues de souches marines sont référencées) et d'autre part de caractériser potentiellement de nouvelles familles de dépolymérases. Le risque de ne pas trouver de nouvelles dépolymérases de PHA semble limité puisqu'une analyse succinte des génomes disponibles dans la base de données Microscope

nous a déjà permis d'identifier de potentielles dépolymérases de PHA. En revanche, comme dit précedemment, aucunes enzymes intervenant dans les premières étapes de la dégradation des PE n'a à ce jour été mis en évidence mais nous espèrons que la stratégie que nous proposons permettra leur identification.

D. Synthèse des enzymes et Activité enzymatique

Collaborateurs : Jean-François Ghiglione (CNRS/LOMIC[1]), Stéphane Bruzaud (IRDL[2]), Boris Eyheraguibel (ICCF[6]) et le Genoscope (LGBM[7])

L'activité des enzymes clés de l'étape initiale de la dépolymérisation qui auront été identifiées, sera systématiquement validée *in vitro*. Les enzymes recombinantes seront toutes synthétisées et purifiées comme cela a été présenté dans le chapitre IV. L'activité catalytique des enzymes sera évaluée par (i) diminution de la turbidité des granules de PHBV en solution comme testé avec ALSP_2657 pour les PHAscl, (ii) mesure de la libération de monomères par de l'absorbance à 210nm pour la dégradation enzymatique de films de PHAscl/mcl (Mukai, Yamada et Doi, 1993a et b), et (iii) chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse (LC-MS) couplée à de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) spécifiques pour doser les oligomères de PE (technique développée par l'ICCF, Eyheraguibel, 2018). Dans le cas des films de PHA, un suivi de perte de poids, une approche en microscopie à balayage électronique (MEB) et de couplage microbalance à cristal quartz /microscopie à force atomique (AFM) (Yamashita et al., 2005 ; Kikkawa et al.,2003) complèteront l'analyse de l'activité catalytique des enzymes.

L'ensemble de ces tests nous permettra de comparer les activités enzymatiques intra- et inter-polymères. Par ailleurs, nous regarderons s'il existe une corrélation entre l'activité et la séquence primaire, voire tertiaire, de la protéine.

E. Procédé amélioré

Collaborateurs : Genoscope (L2BMS[8], LGBM[7])

La première avancée majeure dans le domaine du recyclage enzymatique est apparue avec la possibilité de dépolymériser un minimum de 90 % de PET en monomère en environ 10 heures (Tournier *et al.,* 2020). Cette approche, développée par la société Carbios (https://www.carbios.com/fr/), a permis la production des premières bouteilles contenant 100 % d'acide téréphtalique recyclé en 2020 jusqu'au lancement de leur premier démonstrateur industriel prévu en septembre 2021. Par ailleurs, Carbiolice (une filiale de Carbios) a annoncé en septembre 2021 avoir obtenu la certification « OK Compost HOME » des emballages rigides à base d'acide polylactique grâce à l'additif Evanesto® (https://www.carbiolice.com/). Rappelons que jusqu'alors, le PLA n'était biodégradable qu'en condition de compost industriel. L'additif enzymatique

est ajouté au PLA lors des processus de transformation traditionnels, rendant désormais ce polymère compostable en conditions domestiques. Cependant, à ce jour, le PLA reste malgré tout non biodégradable en milieu marin (information venant de Carbiolice). Dans la lignée de ce qui est fait pour le PET et le PLA, il semble pertinent de se pencher à plus long terme sur des procédés pour améliorer les activités enzymatiques des dépolymérases, comme par exemple en faisant de l'optimisation par *DNA-shuffling* (Stemmer, 1994) ou par évolution programmée dans des systèmes de culture continue GM3 (Marlière *et al.*, 2011). La méthode de *DNA-shuffling* consiste en une fragmentation des gènes codant les protéines d'intérêt suivie de plusieurs PCRs permettant le réassemblage des gènes de manière artificielle. Ces gènes synthétiques sont ensuite clonés et l'activité enzymatique de chaque nouvelle protéine est testée. Une autre méthode pour améliorer les activités enzymatiques est de soumettre les souches produisant ces enzymes (naturelles ou après clonage du gène d'intérêt dans une souche réceptrice), a une forte pression de sélection via un système de culture en continu (GM3) afin de générer des mutations qui vont permettre une sélection des cellules les mieux adaptées. Ce système de culture GM3 a été développé par un partenariat Genoscope et des collaborateurs (désormais société Altar) et cette plateforme est mise à disposition pour des projets collaboratifs (https://www.ibisba.eu/Services/Subsidised-Access/TNA-Platforms/GEN-GM3).

F. Analyse du suivi de la plastisphère

Collaborateurs : Jean-François Ghiglione (CNRS/LOMIC[1]), la fondation Tara Océan[9] et le Genoscope (LS[4], LIS[5])

Tout au long de ce projet, des analyses de la composition microbienne de la plastisphère sera réalisée. Ces analyses metabarcode 16S seront effectués en utilisant les primers 515-F/926-R (Parada, Needham, et Fuhrman, 2016) permettant d'amplifier la région V4-V5 de l'ARNr 16S et très largement utilisés dans les études de communautés microbiennes marines. Ces amplicons seront séquencés en Illumina (2*250 nt) et environ 50000 séquences dites « valides » seront générées. Ces amplifications seront réalisées sur les communautés détachées des polymères immergés pour l'isolement de souches et des communautés complexes de l'expérimentation ^{13}C DNA-SIP. Dans les deux cas, un suivi temporel (un prélèvement par mois, sur plusieurs mois (voire années)) sera réalisé afin d'avoir une image de l'évolution de la communauté en fonction de l'évolution de la dégradation et de la fraction dite « opportunistes » par rapport à celle des « biodégradeurs ». Ces données sur les communautés seront comparées à celles issues de campagnes sur le terrain (Tara microplastiques 2019, MicMac, Tara microbiomes) pendant lesquelles des échantillons ont été prélevés et dont la composition des polymères et le taux de dégradation ont été évalués.

3. Calendrier

Le travail que je propose présente différents axes et pourra faire l'objet de plusieurs masters et thèses. Par ailleurs, certains aspects pourront être traités dans un court terme, tandis que d'autres sont prévus à moyen et long termes. A titre d'exemple, je vous propose ci-dessous quelques répartitions de ce travail de recherche pouvant faire l'objet de sujets de thèses.

Un premier sujet de thèse pourrait être : **De la recherche de biodégradeurs marins de PHAscl à la validation fonctionnelle**. Cette étude comprendrait la remise en culture des 10 souches déjà isolées, la validation des phénotypes de dégradation, le séquençage de l'ADN génomique, l'analyse fonctionnelle prédite de ces 10 génomes axée sur la dégradation du polymère afin de définir les transcriptomes les plus pertinents à séquencer, et pour finir l'étude des données fonctionnelles afin de définir un ou plusieurs schémas de dégradation des PHAscl. Un diagramme de Gant pour les trois années de thèse est présenté ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Analyse des souches																																				
Remise en culture et revalidation des phénotypes	X	X	X	X	X	X	X	X																												
Extraction ADN-ARN/Séquençage								X	X	X	X	X																								
Intégration plateforme Microscope												X	X	X	X																					
Analyse des génomes														X	X	X	X																			
Analyses fonctionnelles des souches d'intérêt																																				
Séquençage transcriptome																		X	X	X																
Intégration plateforme Microscope																					X	X														
Analyse des transcriptomes																							X	X	X	X	X									
Compilation des résultats et rédaction de thèse																												X	X	X	X	X	X	X	X	X

Un deuxième sujet de thèse pourrait commencer après la première année de celle présentée ci-dessus en se focalisant dans un premier temps sur les résultats déjà obtenus de la communauté complexe de l'expérimentation du DNA-SIP-MetaG issu du ^{13}C-PHBV. Après avoir exploré le génome des MAGs venant de la fraction lourde en se penchant principalement sur la dégradation du PHBV, l'étudiant pourra comparer ses analyses (en terme de contenu génique, organisation…) avec celles obtenues dans le cadre des souches isolées. Ensuite, les dépolymérases (celles qui auront été validées par les analyses d'expression différentielles et celle identifiées dans les MAGs) seront alors synthétisées et leur activité sera testée. Le sujet de cette thèse pourrait être : **De la prédiction à la validation de l'activité des enzymes clés de la phase initiale de biodégradation des PHAscl**. L'organisation de cette thèse est présentée ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Analyse de la communauté complexe																																				
Comparaison globale des fractions ^{13}C et ^{12}C de la communauté complexe	X	X	X																																	
Analyses des fonctions prédites dans les MAGs				X	X	X	X																													
Analyse des données MétaG en regard des analyses transcriptomiques des souches cultivées								X	X	X	X																									
Activités enzymatiques																																				
Optimisation des protocoles déjà testés avec enzymes de référence												X	X	X																						
Synthèses des dépolymérases														X	X	X	X																			
Tests et optimisations des activités enzymatiques *in vitro*																		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
Compilation des résultats et rédaction de thèse																												X	X	X	X	X	X	X	X	X

Bien que les travaux qui seront menés sur les PHAmcl et PE vieillis demanderont beaucoup plus de temps de mise en place lié à la nature même de ces polymères (qui demande plus de temps pour la dégradation que celle observée pour des PHAscl), ils peuvent dès à présent être initiés.

4. Conclusion

Le projet que je présente se déroulera sur plusieurs années et sera dépendant du temps de biodégradation obtenu en fonction des polymères testés. Il permettra de caractériser des processus de dégradation en milieu marin de plastiques biosourcés et biodégradables d'une part et de plastiques conventionnels vieillis d'autre part. L'identification des gènes des souches isolées qui sont impliqués dans le métabolisme de la dégradation des polymères se fera grâce à l'analyse différentielle d'expression. On pourra ainsi établir la complémentarité des données de génomique/transcriptomique et de métagénomique comme outils de génomique fonctionnelle environnementale pour dessiner un paysage complet des potentiels de biodégradation des polymères en milieu naturel. Ceci permettra également de confirmer ou d'infirmer le schéma des voies de dégradation proposées dans la littérature (revue jacquin 2019). Par ailleurs, ce projet de recherche permettra de reconstruire un/des modèle(s) métabolique(s), inconnu(s) à ce jour, pour repérer de potentiels microorganismes capables de biodégrader ces polymères dans une communauté naturelle complexe. Cela permettra de différencier les espèces contribuant au processus de dégradation et les opportunistes. Les enzymes clés impliquées dans la biodégradation seront mises en évidence aussi bien à partir d'un système cultural que d'une communauté environnementale. Bien sûr, la validation *in vitro* de l'activité des enzymes clés de l'étape initiale sera indispensable pour affirmer la fonction des gènes codant ces protéines. En parallèle, l'analyse de la composition de la plastisphère sur du long terme permettra d'avoir une image de l'évolution des communautés, et notamment des biodégradeurs, et de comparer ces données avec des données environnementales.

Dans ce projet, il y a une part de risques notamment concernant les PHAmcl et le PE vieilli. Ces risques sont plus axés sur la mise en œuvre des conditions de suivi de la depolymérisation pour les PHAmcl alors

qu'ils sont plus orientés sur le temps d'observation de cette biodégradation pour les PE. Néanmoins, des résultats de tests préliminaires nous laissent à penser que ces risques devraient être limités.

Tout ce travail sera un socle pour des recherches plus appliquées dans le domaine du recyclage enzymatique afin de rentrer dans la lignée d'une économie circulaire du plastique, indispensable de nos jours.

Acronyme des laboratoires :

Genoscope :

[3] LABGeM :Laboratoire de Bio-informatique en Génomique et Métabolisme

[4] LS : Laboratoire de Séquençage

[5] LIS : Laboratoire d'informatique scientifique

[7] LGBM: Laboratoire de Génomique et Biochimie du Métabolisme

[8] L2BMS : Laboratoire de Biocatalyse, Biorémédiation et Métabolisme Synthétique

Autres laboratoires :

[1] LOMIC : Laboratoire d'Océanographie Microbienne

[2] IRDL : Institut de Recherche Dupuy de Lôme

[6] ICCF : Institut de Chimie de Clermont-Ferrand

[9]La Fondation Tara Océans

Conclusion Générale

Ce mémoire vous a présenté près de 30 ans d'immersion quasi-totale dans la génomique. J'ai vu naître et se développer cette discipline qui a révolutionné les idées reçues et les connaissances des génomes et de la biodiversité. Ce sera toujours pour moi une fierté d'avoir participé à cette aventure qu'a été le séquençage du génome humain et je garderai en mémoire la réaction de la communauté scientifique à l'annonce, faite par le Genoscope, de l'estimation du nombre de gènes humain à 25 000 alors que tout le monde en prévoyait 100 000.

Bien qu'une grande partie de ma carrière n'ait pas été dédiée directement à de la recherche, je ne m'en suis jamais vraiment éloignée grâce aux projets collaborateurs dont j'étais responsable. Régulièrement, des réunions de travail avaient lieu durant lesquelles je participais aux échanges scientifiques. Par ailleurs, la diversité des sujets de ces projets m'ont permis d'acquérir des connaissances dans un grand nombre de domaines. La contrepartie a en revanche été de ne jamais avoir vraiment eu le temps d'approfondir une thématique. Ceci étant, dès que j'en avais l'occasion, que cela ait été auprès des membres du Laboratoire, d'étudiants, ou encore de collaborateurs, j'ai toujours essayé de transmettre mes compétences. Néanmoins, le souhait de réorienter ma carrière vers une thématique qui me tient à cœur et de m'y spécialiser va me permettre d'évoluer dans ce domaine et de guider des étudiants qui souhaitent s'engager dans une thèse.

Les recherches que je mène depuis ces dernières années n'en sont qu'à leurs prémices. Après une phase d'adaptation pendant laquelle je me suis imprégnée des expertises développées au LOMIC, j'ai développé mon propre axe de recherche autour de la biodégradation des platisques. L'identification des souches impliquées dans la dégradation et l'analyse de leurs génomes/transcriptomes permet d'avoir une vue d'ensemble des voies métaboliques empruntées lors de ce processus. L'identification des enzymes intervenant dans les premières étapes de la dépolymérisation et la validation de leur activité conduit à un champ potentiel de solutions alternatives aux plastiques conventionnels incluant le recyclage enzymatique de ces polymères afin de rentrer dans la lignée d'une économie circulaire du plastique.

Grâce à l'étude des microplastiques en milieu marin, j'ai la fabuleuse opportunité de travailler sur une thématique professionnelle qui rejoint mes opinions personnelles. Amoureuse de la mer, il m'est toujours difficile de constater la dégradation de cet environnement. J'ai réalisé que j'avais un pouvoir énorme entre les mains : celui de contribuer à un changement de nos us et coutumes. Ces dernières années, il y a eu une révolution de la prise de conscience de l'impact du plastique sur l'environnement et la santé. Cette notion est d'ailleurs rentrée dans les schémas directeurs de certaines entreprises du CAC40 qui ont bien compris que le consommateur souhaitait changer son mode de consommation. De même, les politiques ont voté des lois concernant l'utilisation des emballages à usage unique (même si parfois certaines décisions à ce

sujet me laissent perplexes). Je pense que nous sommes à un tournant de notre monde moderne (tout du moins, j'ose l'espérer). Et pour ma part, j'essaie simplement de contribuer à ce changement. Cela se traduit personnellement par mon mode de vie et professionnellement au travers de mes recherches mais surtout aussi au travers de la communication que j'essaie de disséminer dès que l'occasion se présente (que cela soit aussi bien professionnellement que personnellement). Et pour finir, c'est dans cette lignée que je m'investis dans la communauté PLASTnet en espérant qu'un jour la thématique de l' « économie circulaire du plastique » puisse rentrer dans un axe phare du CEA : qui ne tente rien, n'a rien !

Références Bibiographiques

Ali I and Jamil N. 2016. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. Front Biol 11: 19–27. doi: 10.1007/s11515-016-1389-z

Altshuler I, Raymond-Bouchard I, Magnuson E, Tremblay J, Greer CW, Whyte LG. 2022. Unique high Arctic methane metabolizing community revealed through in situ 13CH4-DNA-SIP enrichment in concert with genome binning. Sci Rep. Jan 21;12(1):1160. doi: 10.1038/s41598-021-04486-z.

Amaral-Zettler L.A., Zettler E.R. and Mincer T.J. 2020. Ecology of the plastisphere. Nat Rev Microbiol 18, 139–151. doi:10.1038/s41579-019-0308-0

Amarasinghe, S.L., Su, S., Dong, X. et al. 2020. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. Genome Biol 21, 30. doi.org/10.1186/s13059-020-1935-5

Ammon U, Wood SA, Laroche O, Zaiko A, Lavery SD, Inglis GJ, Pochon X .2019. Linking Environmental DNA and RNA for Improved Detection of the Marine Invasive Fanworm Sabella spallanzanii. Front. Mar. Sci., . 6:621. doi:10.3389/fmars.2019.00621

Basili M, Quero GM, Giovannelli D, *et al.* 2020. Major Role of Surrounding Environment in Shaping Biofilm Community Composition on Marine Plastic Debris. Front Mar Sci 7. doi : 10.3389/fmars.2020.00262

Bendtsen JD, Kiemer L, Fausbøll A, Brunak S. 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. BMC Microbiol. Oct 7;5:58. doi: 10.1186/1471-2180-5-58.

Boesel LF, Meur SL, Thöny-Meyer L, and Ren Q. 2014. The effect of molecular weight on the material properties of biosynthesized poly(4-hydroxybutyrate). International Journal of Biological Macromolecules 71: 124–30. doi : 10.1016/ j.ijbiomac.2014.04.015

Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker GLA, D'Amore R, Allen AM, et al. 2012 Analysis of the bread wheat genome using whole genome shotgun sequencing. Nature. Nov 29;491(7426):705–10. doi : 10.1038/nature11650

Briassoulis D.. 2007. Analysis of the mechanical and degradation performances of optimised agricultural biodegradable films. Polymer Degradation and Stability 92 . 1115-1132. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.01.024

Bridges CB. 1936. THE BAR "GENE" A DUPLICATION. Science. Feb 28;83(2148):210-1. doi: 10.1126/science.83.2148.210.

Brock M, Maerker C, Schütz A, Völker U, Buckel W. 2002. Oxidation of propionate to pyruvate in Escherichia coli. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase. Eur J Biochem. Dec;269(24):6184-94. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03336.x.

Bornscheuer UT. 2016. MICROBIOLOGY. Feeding on plastic. Science. Mar 11;351(6278):1154-5. doi: 10.1126/science.aaf2853.

Bruzaud S, 2021. Polyesters biosourcés et/ou biodégradables – De l'élaboration à la fin de vie. Technique de l'ingénieur. Réf : CHV4039 v1

Bryant JA., Clemente TM., Viviani DA., Fong AA., Thomas KA., Kemp P., et al. 2016. Diversity and activity of communities inhabiting plastic debris in the North Pacific Gyre. mSystems. 1:e00024–16. doi: 10.1128/mSystems.00024-16

Cao H, Hastie AR, Cao D, Lam ET, Sun Y, Huang H, et al. 2014. Rapid detection of structural variation in a human genome using nanochannel-based genome mapping technology. GigaSci. Dec;3(1):34. doi: 10.1186/2047-217X-3-34

Carlton JT, Chapman JW, Geller JB, Miller JA, Carlton DA, McCuller MI, Treneman NC, Steves BP, Ruiz GM. 2017. Tsunami-driven rafting: Transoceanic species dispersal and implications for marine biogeography. Science (New York, N.Y.). 357: 1402-1406. doi: 10.1126/Science.Aao1498

Carson HS., Nerheim MS., Carroll KA., Eriksen M. 2013. The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. Mar Pollut Bull. 75(1-2):126–32. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.07.054.

Carus M., Dammer L., Raschka A., Skoczinski P. 2020. « Renewable Carbon: Key to a Sustainable and Future-oriented Chemical and Plastic Industry: Definition, Strategy, Measures and Potential ». Greenhouse Gases: Science and Technology 10(3): 488-505. doi : 10.1002/ghg.1992

Castro-Sowinski S, Burdman S, Matan O, and Okon Y. 2010. Natural Functions of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. In: Chen GG-Q (Ed). Plastics from Bacteria. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-03287-5_3.

Catão ECP, Pollet T, Misson B, Garnier C, Ghiglione JF, Barry-Martinet R, Maintenay M, Bressy C, Briand JF. 2019. Shear Stress as a Major Driver of Marine Biofilm Communities in the NW Mediterranean Sea. Front Microbiol. Jul 31;10:1768. doi: 10.3389/fmicb.2019.01768.

Chapron L., Péru E., Engler A., Ghiglione JF., Meistertzheim A., Pruski AM., Purser A., Vétion G., Galand PE., Lartaud F. 2018. Macro- and microplastics affect cold-water corals growth, feeding and behaviour. Scientific Reports, Nature Publishing Group. 8 (1), pp.15299. doi :10.1038/s41598-018-33683-6ff.

Chaumeil PA, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. 2019. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. Bioinformatics. Nov 15;36(6):1925–7. doi: 10.1093/bioinformatics/btz848.

Chiang C, Scott AJ, Davis JR, Tsang EK, Li X, Kim Y, Hadzic T, Damani FN, Ganel L; GTEx Consortium, Montgomery SB, Battle A, Conrad DF, Hall IM. 2017. The impact of structural variation on human gene expression. Nat Genet. May;49(5):692-699. doi: 10.1038/ng.3834.

Choulet F, Alberti A, Theil S, Glover N, **Barbe V**, …,Quesneville H, Wincker P, Feuillet C. 2014. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. Science. Jul 18;345(6194):1249721. doi:10.1126/science.1249721.

Cristescu ME. 2019. Can Environmental RNA Revolutionize Biodiversity Science? Trends Ecol Evol. 2019 Aug;34(8):694-697. doi: 10.1016/j.tree.2019.05.003.

de la Peña Mattozzi M., Kang Y., Keasling J.D. 2010. Feast: Choking on Acetyl-CoA, the Glyoxylate Shunt, and Acetyl-CoA-Driven Metabolism. In: Timmis K.N. (eds) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg. doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_116

Dobretsov, S. 2010. Marine Biofilms. In Biofouling (pp. 123-136). wiley. doi: 10.1002/9781444315462.ch9.

Dolan SK, Welch M. 2018. The Glyoxylate Shunt, 60 Years On. Annu Rev Microbiol. Sep 8;72:309-330. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062257.

Dumont MG, Murrell JC.. 2005. Stable isotope probing - linking microbial identity to function. Nature Reviews Microbiology. 3(6):499-504. doi: 10.1038/nrmicro1162

Dunford EA, Neufeld JD. 2010. DNA stable-isotope probing (DNA-SIP). J Vis Exp. Aug 2;(42):2027. doi: 10.3791/2027.

Dussud C, Ghiglione JF. 2014. Biodégradation des plastiques en mer. Société française d'Ecologie, Regards et débats sur la biodiversité N°63.

Dussud C., Meistertzheim AL., Conan P., Pujo-Pay M., George M., Fabre P., Coudane J., Higgs P., Elineau A., Pedrotti ML., Gorsky G., Ghiglione JF. 2018a. Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. Environ Pollut. May;236:807-816. doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.027.

Dussud C, Hudec C, George M, Fabre P, Higgs P, Bruzaud S, Delort AM, Eyheraguibel B, Meistertzheim AL, Jacquin J, Cheng J, Callac N, Odobel C, Rabouille S, Ghiglione JF. 2018b. Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics by Marine Microorganisms. Front Microbiol. Jul 18;9:1571. doi: 10.3389/fmicb.2018.01571.

Escaramís G, Docampo E, Rabionet R. 2015. A decade of structural variants: description, history and methods to detect structural variation. Brief Funct Genomics. Sep;14(5):305-14. doi: 10.1093/bfgp/elv014

Eubeler JP, Zok S, Bernhard M, and Knepper TP. 2009. Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. TrAC Trends in Analytical Chemistry 28: 1057–72. doi: 10.1016/j.trac.2009.06.007

Eyheraguibel B, Leremboure M, Traikia M, Sancelme M, Bonhomme S, Fromageot D, Lemaire J, Lacoste J, Delort AM. 2018. Environmental scenarii for the degradation of oxo-polymers. Chemosphere. May;198:182-190. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.01.153.

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. 2006. Structural variation in the human genome. Nat Rev Genet. Feb;7(2):85-97. doi: 10.1038/nrg1767.

Frère L, Maignien L, Chalopin M, Huvet A, Rinnert E, Morrison H, et al. 2018. Microplastic bacterial communities in the Bay of Brest: influence of polymer type and size. Environ Pollut. 242(Pt A):614–25. doi: 10.1016/ j.envpol.2018.07.023

Fujita Y, Matsuoka H, Hirooka K. 2007. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. Mol Microbiol. Nov;66(4):829-39. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05947.x.

Gao L, Gonda I, Sun H, Ma Q, Bao K, Tieman DM, et al. 2019. The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. Nature Genetics. Jun;51(6):1044. doi: 10.1038/s41588-019-0410-2.

García-Gómez JC., Garrigós M. and Garrigós J.. 2021. Plastic as a Vector of Dispersion for Marine Species With Invasive Potential. A Review. Front. Ecol. Evol., 26 May. doi: 10.3389/fevo.2021.629756

Ghiglione J-F, Galand PE, Pommier T, Pedrós-Alió C., Maas EW., Bakker K., Bertilson S., Kirchman DL., Lovejoy C., Yager PL., Murray AE.. 2012. Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. PNAS 109: 17633–8. doi: 10.1073/pnas.1208160109

Ghiglione JF and Laudet V. 2020. Fish larvae: a polluted Terra Incognita unveils. Current Biology 30: 112–133. doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.083

Gholami A., Mohkam M., Rasoul-Amini S., Ghasemi Y. 2016. gHolaMi . Industrial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria: opportunities and challenges. Minerva Biotecnologica. March;28 (1):59-74

Gimode D, Odeny DA, de Villiers EP, Wanyonyi S, Dida MM, Mneney EE, et al. 2016. Identification of SNP and SSR Markers in Finger Millet Using Next Generation Sequencing Technologies. PLoS ONE. 11(7):e0159437. doi : 10.1371/journal.pone.0159437

Gong C, Du Q, Xie J, Quan M, Chen B, Zhang D. 2018. Dissection of Insertion–Deletion Variants within Differentially Expressed Genes Involved in Wood Formation in Populus. Front Plant Sci. doi=10.3389/fpls.2017.02199

Gravouil K. et al. 2017. « Transcriptomics and Lipidomics of the Environmental Strain Rhodococcus ruber Point out Consumption Pathways and Potential Metabolic Bottlenecks for Polyethylene Degradation » Environ Sci Technol. May 2;51(9):5172-5181. doi: 10.1021/acs.est.7b00846.

Gu, JG., Gu, JD. 2005. Methods Currently Used in Testing Microbiological Degradation and Deterioration of a Wide Range of Polymeric Materials with Various Degree of Degradability: A Review. J Polym Environ 13, 65–74. doi : 10.1007/s10924-004-1230-7

Hahsler, M., Piekenbrock, M., and Doran, D. 2019. dbscan: Fast Density-Based Clustering with R. Journal of Statistical Software, 91(1), 1–30. doi.org/10.18637/jss.v091.i01

Handrick R, Reinhardt S, Kimmig P, Jendrossek D. 2004. The "intracellular" poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of Rhodospirillum rubrum is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. J Bacteriol. Nov;186(21):7243-53. doi: 10.1128/JB.186.21.7243-7253.2004.

Ho, S.S., Urban, A.E. and Mills, R.E. 2020. Structural variation in the sequencing era. Nat Rev Genet ;21, 171–189. doi : 10.1038/s41576-019-0180-9

Hoenen T, Groseth A, Rosenke K, …, Massaquoi M, Munster VJ, Feldmann H. 2016. Nanopore Sequencing as a Rapidly Deployable Ebola Outbreak Tool. Emerg Infect Dis. Feb;22(2):331-4. doi: 10.3201/eid2202.151796. PMID: 26812583; PMCID: PMC4734547.

Hwang JE, Kim S-H, Jung IJ, Han SM, Ahn J-W, Kwon S-J, et al. 2016. Comparative genomic hybridization analysis of rice dwarf mutants induced by gamma irradiation. Genet Mol Res. 2016 Dec 23;15(4). doi : 10.4238/gmr15049092

Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. Nat Genet. Sep;36(9):949-51. doi: 10.1038/ng1416.

İpekog˘lu B, Böke H, and Çizer Ö. 2007. Assessment of material use in relation to climate in historical buildings. Building and Environment 42: 970–8. doi : 10.1016/j.buildenv.2005.10.029

International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). 2014 . A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (Triticum aestivum) genome. Science. Jul 18;345(6194):1251788. doi: 10.1126/science.1251788.

Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., **Barbe, V.**, Meistertzheim, A.-L., Ghiglione, J.-F., 2019. Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the "Plastisphere." Front. Microbiol. 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00865

Jacquin J, Callac N, Cheng J, Giraud C, Gorand Y, Denoual C, Pujo-Pay M, Conan P, Meistertzheim AL, **Barbe V**, Bruzaud S, Ghiglione JF. 2021. Microbial Diversity and Activity During the Biodegradation in Seawater of Various Substitutes to Conventional Plastic Cotton Swab Sticks. Front Microbiol. Jul 15;12:604395. doi: 10.3389/fmicb.2021.604395.

Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Law KL. 2015. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science. Feb 13;347(6223):768-71. doi: 10.1126/science.1260352.

Jap BK, Walian PJ. 1996. Structure and functional mechanism of porins. Physiol Rev. Oct;76(4):1073-88. doi: 10.1152/physrev.1996.76.4.1073.

Jendrossek, D., A. Schirmer, et H. G. Schlegel. 1996. « Biodegradation of Polyhydroxyalkanoic Acids ». Applied Microbiology and Biotechnology 46(5-6): 451-63. doi : 10.1007/s002530050844.

Jendrossek D and Handrick R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. Annu Rev Microbiol 56: 403–32. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160838

Jendrossek D. 2005. Extracellular Polyhydroxyalkanoate (PHA) Depolymerases: The Key Enzymes of PHA Degradation. Biopolymers Online. American Cancer Society. doi: 10.1002/3527600035.bpol3b03

Kang Q, Zhang D. 2020. Principle and potential applications of the non-classical protein secretory pathway in bacteria. Appl Microbiol Biotechnol. Feb;104(3):953-965. doi: 10.1007/s00253-019-10285-4.

Kikkawa Y, Yamashita K, Hiraishi T, Kanesato M, Doi Y. 2005. Dynamic adsorption behavior of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase onto polyester surface investigated by QCM and AFM. Biomacromolecules. Jul-Aug;6(4):2084-90. doi: 10.1021/bm0500751.

Kim DY, Kim HC, Kim SY, Rhee YH. 2005. Molecular characterization of extracellular medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase genes from Pseudomonas alcaligenes strains. J Microbiol. Jun;43(3):285-94.

Kim DY, Kim HW, Chung MG, Rhee YH. 2007. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. J Microbiol. Apr;45(2):87-97.

Kita K, Mashiba S, Nagita M, Ishimaru K, Okamoto K, Yanase H, Kato N. 1997. Cloning of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, Alcaligenes faecalis AE122, and characterization of its gene product. Biochim Biophys Acta. May 2;1352(1):113-22. doi: 10.1016/s0167-4781(97)00011-0.

Keshavarz T and Roy I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. Current Opinion in Microbiology 13: 321–6. doi: 10.1016/j.mib.2010.02.006

Kirstein IV, Wichels A, Krohne G, Gerdts G. 2018. Mature biofilm communities on synthetic polymers in seawater - Specific or general? Mar Environ Res. Nov;142:147-154. doi: 10.1016/j.marenvres.2018.09.028.

Knoll M, Hamm TM, Wagner F, et al. 2009. The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. BMC Bioinformatics 10: 89. doi : 10.1186/1471-2105-10-89

Koedooder C., Guéneuguès A., Van Geersdaële R., Vergé V., Bouget FY., Labreuche Y., Obernosterer I., Blain S. 2018. The Role of the Glyoxylate Shunt in the Acclimation to Iron Limitation in Marine Heterotrophic Bacteria. Frontiers in Marine Science Nov 5 : 21. doi=10.3389/fmars.2018.00435

Krueger MC, Harms H, and Schlosser D. 2015. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. Appl Microbiol Biotechnol 99: 8857–74. doi: 10.1007/s00253-015-6879-4

Lal A., Brown M., Mohan R., Daw J., Drake J., Israeli J. 2021. Improving long-read consensus sequencing accuracy with deep learning. bioRxiv preprint. doi: 10.1101/2021.06.28.450238.

Lambert S, Tragin M, Lozano JC, Ghiglione JF, Vaulot D, Bouget FY, Galand PE. 2019. Rhythmicity of coastal marine picoeukaryotes, bacteria and archaea despite irregular environmental perturbations. ISME J. Feb;13(2):388-401. doi: 10.1038/s41396-018-0281-z.

Laporte DC, Stueland CS, Ikeda TP. 1989. Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. Biochimie. Sep-Oct;71(9-10):1051-7. doi: 10.1016/0300-9084(89)90110-7.

Li, Z., Lin, H., Ishii, N., Chen, G., & Inoue, Y. 2007. Study of enzymatic degradation of microbial copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. Polymer Degradation and Stability, 92, 1708-1714. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.06.001

Lu H, Giordano F, Ning Z. 2016. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. Genomics Proteomics Bioinformatics. Oct;14(5):265–79. doi: 10.1016/j.gpb.2016.05.004.

Ludwig B.. 1987. Cytochrome c oxidase in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews, Volume 3, Issue 1, March, Pages 41–56. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02451.x.

Lyons E, Freeling M, Kustu S, Inwood W. 2011. Using Genomic Sequencing for Classical Genetics in E. coli K12. PLoS One. doi : 10.1371/journal.pone.0016717

Maldonado dos Santos JV, Valliyodan B, Joshi T, Khan SM, Liu Y, Wang J, et al. 2016. Evaluation of genetic variation among Brazilian soybean cultivars through genome resequencing. BMC Genomics. Feb 13;17(1):110. doi: 10.1186/s12864-016-2431-x

Margulies M, Egholm M, Altman WE, …, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature. Sep 15;437(7057):376-80. doi: 10.1038/nature03959.

Marlière P, Patrouix J, Döring V, Herdewijn P, Tricot S, Cruveiller S, Bouzon M, Mutzel R. 2011. Chemical evolution of a bacterium's genome. Angew Chem Int Ed Engl. Jul 25;50(31):7109-14. doi: 10.1002/anie.201100535.

Martinez Tobon DI.,2019. Biodegradation of Polyhydroxybutyrate by Bacterial Strains, Native Extracellular PHB Depolymerases, and Structural Variants. doi: 10.7939/r3-kjws-h568

Meereboer, Kjeld W., Manjusri Misra, Amar K. Mohanty. 2020. « Review of Recent Advances in the Biodegradability of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Bioplastics and Their Composites ». Green Chemistry 22(17): 5519-58. doi : 10.1039/D0GC01647K

Meyers LA, Levin DA. 2006. On the abundance of polyploids in flowering plants. Evolution. Jun;60(6):1198-206.

Mezzolla V, D'Urso OF, and Poltronieri P. 2018. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. Polymers (Basel) 10. doi: 10.3390/polym10080910

Michael TP, Jupe F, Bemm F, Motley ST, Sandoval JP, Lanz C, Loudet O, Weigel D, Ecker JR. 2018. High contiguity Arabidopsis thaliana genome assembly with a single nanopore flow cell. Nat Commun. Feb 7;9(1):541. doi: 10.1038/s41467-018-03016-2.

Mistry J, Chuguransky S, Williams L, Qureshi M, Salazar GA, Sonnhammer ELL, Tosatto SCE, Paladin L, Raj S, Richardson LJ, Finn RD, Bateman A. 2021. Pfam: The protein families database in 2021. Nucleic Acids Res. Jan 8;49(D1):D412-D419. doi: 10.1093/nar/gkaa913.

Mohee R, Unmar GD, Mudhoo A, and Khadoo P. 2008. Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. Waste Manag 28: 1624–9. doi: 10.1016/j.wasman.2007.07.003

Morohoshi T, Ogata K, Okura T, Sato S. 2018. Molecular Characterization of the Bacterial Community in Biofilms for Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) Films in Seawater. Microbes Environ. Mar 29;33(1):19-25. doi: 10.1264/jsme2.ME17052.

Morohoshi T, Oi T, Suzuki T, Sato S. 2020. Identification and characterization of a novel extracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase in the complete genome sequence of Undibacterium sp. KW1 and YM2 strains. PLoS One. May 5;15(5):e0232698. doi: 10.1371/journal.pone.0232698.

Mukai K., Yamada K., Doi Y.. 1993a. Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by a marine bacterium, Polym. Degrad. Stab., 41, p. 85. doi.org/10.1016/0141-3910(93)90066-R.

Mukai K, Yamada K, Doi Y. 1993b. Kinetics and mechanism of heterogeneous hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHA depolymerases. Int J Biol Macromol. Dec;15(6):361-6. doi: 10.1016/0141-8130(93)90054-p.

Nederbragt, Lex. 2016. Developments in NGS. figshare. Dataset. doi.org/10.6084/m9.figshare.100940.v9

Oberbeckmann S, Osborn AM, Duhaime MB. 2016. Microbes on a bottle: substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris. PLoS One. 11:1–24. doi : 10.1371/journal.pone.0159289

Oberbeckmann S., Kreikemeyer B., Labrenz M.. 2018. Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics. Front Microbiol. 8:1–12. doi: 10.3389/fmicb.2017.02709

Obruca IS. 2010. controlled production and degradation of selected biomaterials. PhD: 42.

Odobel C, Dussud C, Philip L, Derippe G, Lauters M, Eyheraguibel B, Burgaud G, Ter Halle A, Meistertzheim AL, Bruzaud S, **Barbe V**, Ghiglione JF. 2012. Bacterial Abundance, Diversity and Activity During Long-Term Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics in Seawater. Front Microbiol. Nov 18;12:734782. doi: 10.3389/fmicb.2021.734782.

Ong SY, Chee JY and Sudesh K. (2017). Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. Journal of Siberian Federal University. Biology. 10. 21-225. 10.17516/1997-1389-0024.

Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. Environ Microbiol. May;18(5):1403-14. doi: 10.1111/1462-2920.13023.

Planes S, Allemand D, Agostini S, Banaigs B, Boissin E, Boss E, Bourdin G, Bowler C, Douville E, Flores JM, Forcioli D, Furla P, Galand PE, Ghiglione JF, Gilson E, Lombard F, Moulin C, Pesant S, Poulain J, Reynaud S, Romac S, Sullivan MB, Sunagawa S, Thomas OP, Troublé R, de Vargas C, Vega Thurber R, Voolstra CR, Wincker P, Zoccola D; Tara Pacific Consortium. 2019. The Tara Pacific expedition-A pan-ecosystemic approach of the "-omics" complexity of coral reef holobionts across the Pacific Ocean. PLoS Biol. Sep 23;17(9):e3000483. doi: 10.1371/journal.pbio.3000483.

Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., Segura, D. 2014. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. Microb. Biotech. 7, 278-293. doi: 10.1111/1751-7915.12129.

Pinosio S, Giacomello S, Faivre-Rampant P, Taylor G, Jorge V, Le Paslier MC, et al. 2016. Characterization of the Poplar Pan-Genome by Genome-Wide Identification of Structural Variation. Mol Biol Evol. 2016 Oct;33(10):2706–19. doi: 10.1093/molbev/msw161

Plastic Europe 2020 : https://www.plasticseurope.org/application/files/3416/2270/7211/Plastics_the_facts-WEB-2020_versionJun21_final.pdf.

Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, D'Antonio D, Savini V, Di Bonaventura G. 2008. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by Stenotrophomonas maltophilia: the role of cell surface hydrophobicity and motility. FEMS Microbiol Lett. Oct;287(1):41-7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01292.x.

Prunier J, Caron S and MacKay J. 2017. CNVs into the wild: screening the genomes of conifer trees (Picea spp.) reveals fewer gene copy number variations in hybrids and links to adaptation. BMC Genomics. Dec;18(1):97. doi : 10.1186/s12864-016-3458-8

Prunier J, Giguère I, Ryan N, Guy R, Soolanayakanahally R, Isabel N, et al. 2019. Gene copy number variations involved in balsam poplar (Populus balsamifera L.) adaptive variations. Mol Ecol. Mar;28(6):1476–90. doi: 10.1111/mec.14836.

Pucker B, Holtgräwe D, Rosleff Sörensen T, Stracke R, Viehöver P, Weisshaar B. A. 2016. De Novo Genome Sequence Assembly of the Arabidopsis thaliana Accession Niederzenz-1 Displays Presence/Absence Variation and Strong Synteny. Vandepoele K, editor. PLoS ONE. Oct 6;11(10):e0164321. doi : 10.1371/journal.pone.0164321

Rajan KP., Selvin T., Gopanna A, Chavali M. 2018. « Polyhydroxybutyrate (PHB): A Standout Biopolymer for Environmental Sustainability ». In Handbook of Ecomaterials, éd. Leticia Myriam Torres Martínez, Oxana Vasilievna Kharissova, et Boris Ildusovich Kharisov. Cham: Springer International Publishing, 1-23. doi: 10.1007/978-3-319-48281-1_92-1.

Redmond SN, Sharma A, Sharakhov I, Tu Z, Sharakhova M, Neafsey DE. 2020. Linked-read sequencing identifies abundant microinversions and introgression in the arboviral vector Aedes aegypti. BMC Biol. Dec;18(1):26. doi : 10.1186/s12915-020-0757-y

Reis MAM, Serafim LS, Lemos PC, et al. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. Bioprocess Biosyst Eng 25: 377–85. doi: 10.1007/s00449-003-0322-4.

Rhoads A, Au KF. 2015. PacBio Sequencing and Its Applications. Genomics Proteomics Bioinformatics. Oct;13(5):278–89. doi: 10.1016/j.gpb.2015.08.002

Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR, Briand JF. 2013. Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. Environ Microbiol. Nov;15(11):2879-93. doi: 10.1111/1462-2920.12186.

Sandhir, Rajat. 2014. Metabolic Pathways: Lipid Metabolism. 10.1016/B978-0-12-384730-0.00200-7.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.

Sauret C, Ghiglione JF .2013. Monitoring of oil-degrading bacteria by stable isotope probing. In Multi-author publication project on a Comprehensive Handbook (or Practical Guide) of ecotoxicological terms (Férard, J.F. and Blaise, C., editors). Springer Publishers, Inc. pp 751-766.

Sauret C, Séverin T, Vétion G, Guigue C, Goutx M, Pujo-Pay M, Conan P, Fagervold SK, Ghiglione JF. 2014. 'Rare biosphere' bacteria as key phenanthrene degraders in coastal seawaters. Environ Pollut. Nov;194:246-253. doi: 10.1016/j.envpol.2014.07.024.

Sauret C, Tedetti M, Guigue C, Dumas C, Lami R, Pujo-Pay M, Conan P, Goutx M, Ghiglione JF. 2016. Influence of PAHs among other coastal environmental variables on total and PAH-degrading bacterial communities. Environ Sci Pollut Res Int. Mar;23(5):4242-56. doi: 10.1007/s11356-015-4768-0.

Schirmer A, Jendrossek D. 1994. Molecular characterization of the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] depolymerase gene of Pseudomonas fluorescens GK13 and of its gene product. J Bacteriol. Nov;176(22):7065-73. doi: 10.1128/jb.176.22.7065-7073.1994.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. Science. Jul 23;305(5683):525-8. doi: 10.1126/science.1098918.

Senior PJ, Dawes EA. 1973. The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in Azotobacter beijerinckii. Biochem J. May;134(1):225-38. doi: 10.1042/bj1340225. PMID: 4723225; PMCID: PMC1177803.

Shah AA, Hasan F, Hameed A, and Ahmed S. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances 26: 246–65. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005

Sharma V., Sehgal R., Gupta R. 2021. « Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications ». Polymer 212: 123161. doi : 10.1016/j.polymer.2020.123161

Shiraki M, Endo T, Saito T. 2006. Fermentative production of (R)-(-)-3-hydroxybutyrate using 3-hydroxybutyrate dehydrogenase null mutant of Ralstonia eutropha and recombinant Escherichia coli. J Biosci Bioeng. Dec;102(6):529-34. doi: 10.1263/jbb.102.529.

Shirakura Y, Fukui T, Saito T, Okamoto Y, Narikawa T, Koide K, Tomita K, Takemasa T, Masamune S. 1986. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from Alcaligenes faecalis T1. Biochim Biophys Acta. Jan 15;880(1):46-53. doi: 10.1016/0304-4165(86)90118-2.

Silva MM., Maldonado GC., Castro RO., de Sá Felizardo J., Cardoso RP., Anjos RMD., Araújo FV. 2019. Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara Bay, RJ, Brazil.Mar Pollut Bull. Apr;141:561-568. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.02.064.

Singer E, Wagner M, Woyke T. 2017. Capturing the genetic makeup of the active microbiome in situ. ISME J. Sep;11(9):1949-1963. doi: 10.1038/ismej.2017.59.

Singh, B., and Sharma, N.. 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. Polym. Degrad. Stab. 93, 561–584. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008.

Skoczinski P., Krause L., Raschka A., Dammer L., Carus M.,. 2021. « Current Status and Future Development of Plastics: Solutions for a Circular Economy and Limitations of Environmental Degradation ». In Methods in Enzymology, Elsevier, 26 march;1-26. doi: 10.1016/bs.mie.2020.11.001

Sloan DB, Wu Z, Sharbrough J. 2018. Correction of Persistent Errors in Arabidopsis Reference Mitochondrial Genomes. Plant Cell. Mar;30(3):525-527. doi: 10.1105/tpc.18.00024.

Springer NM, Ying K, Fu Y, Ji T, Yeh C-T, Jia Y, et al. 2009. Maize Inbreds Exhibit High Levels of Copy Number Variation (CNV) and Presence/Absence Variation (PAV) in Genome Content. PLOS Genetics. 2009 Nov 20;5(11). doi : 10.1371/journal.pgen.1000734

Stemmer, W. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature 370, 389–391. https://doi.org/10.1038/370389a0

Sudhakar M, Doble M, Murthy PS, and Venkatesan R. 2008. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. International Biodeterioration & Biodegradation 61: 203–13. doi: 10.1016/j.ibiod.2007.07.011

Sugiyama A, Kobayashi T, Shiraki M, Saito T. 2004. Roles of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase and 3HB-oligomer hydrolase in bacterial PHB metabolism. Curr Microbiol. Jun;48(6):424-7. doi: 10.1007/s00284-003-4227-x.

Swanson-Wagner RA, Eichten SR, Kumari S, Tiffin P, Stein JC, Ware D, et al. 2010. Pervasive gene content variation and copy number variation in maize and its undomesticated progenitor. Genome Res. Jan 12;20(12):1689–99. doi: 10.1101/gr.109165.110.

Tamames J, Puente-Sánchez F. 2019. SqueezeMeta, A Highly Portable, Fully Automatic Metagenomic Analysis Pipeline. Front Microbiol. Jan 24;9:3349. doi: 10.3389/fmicb.2018.03349.

Tebaldi ML, Maia ALC, Poletto F, et al. 2019. Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility. Journal of Drug Delivery Science and Technology 51: 115–26. doi: 10.1016/j.jddst.2019.02.007

The 1001 Genomes Consortium, Alonso-Blanco C, Andrade J, Becker C, Bemm F, Bergelson J, et al. 2016. 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in Arabidopsis thaliana. Cell. Jul 14;166(2):481–91. doi : 10.1016/j.cell.2016.05.063

Tournier V, Topham CM, Gilles A, David B, Folgoas C, Moya-Leclair E, Kamionka E, Desrousseaux ML, Texier H, Gavalda S, Cot M, Guémard E, Dalibey M, Nomme J, Cioci G, Barbe S, Chateau M, André I, Duquesne S, Marty A. 2020. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. Nature. Apr;580(7802):216-219. doi: 10.1038/s41586-020-2149-4.

Tremblay YD, Hathroubi S, Jacques M. 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. Can J Vet Res. Apr;78(2):110-6.

Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, **Barbe V**, Bocs S, Cruveiller S, Lajus A, Pascal G, Scarpelli C, Médigue C. 2006. MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. Nucleic Acids Res. Jan 10;34(1):53-65. doi: 10.1093/nar/gkj406.

Vallenet D, Calteau A, Cruveiller S, Gachet M, Lajus A, Josso A, Mercier J, Renaux A, Rollin J, Rouy Z, Roche D, Scarpelli C, Médigue C. 2017. MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. Nucleic Acids Res. Jan 4;45(D1):D517-D528. doi: 10.1093/nar/gkw1101.

Wang Y, Chen R, Cai J, et al. 2013. Biosynthesis and Thermal Properties of PHBV Produced from Levulinic Acid by Ralstonia eutropha. PLOS ONE 8: e60318. doi : 10.1371/journal.pone.0060318

Wang Y, Xiong G, Hu J, Jiang L, Yu H, Xu J, et al. 2015. Copy number variation at the GL7 locus contributes to grain size diversity in rice. Nature Genetics. Aug;47(8):944–8. doi: 10.1038/ng.3346

Whittington RJ., Hick P., Fuhrmann M., Liu O., Paul-Pont I. 2021. Removal of oyster pathogens from seawater. Environ Int. May;150:106258. doi: 10.1016/j.envint.2020.106258.

Wright RJ, Erni-Cassola G, Zadjelovic V, Latva M, Christie-Oleza JA. 2020. Marine Plastic Debris: A New Surface for Microbial Colonization. Environ Sci Technol. Oct 6;54(19):11657-11672. doi: 10.1021/acs.est.0c02305.

Wright RJ, Langille MGI, Walker TR. 2021. Food or just a free ride? A meta-analysis reveals the global diversity of the Plastisphere. ISME J. 15:789–806. doi: 10.1038/s41396-020-00814-9

Xing L, Zhang D, Song X, Weng K, Shen Y, Li Y, et al. 2016. Genome-Wide Sequence Variation Identification and Floral-Associated Trait Comparisons Based on the Re-sequencing of the 'Nagafu No. 2' and 'Qinguan' Varieties of Apple (Malus domestica Borkh.). Front Plant Sci. Jun 27;7:908. doi: 10.3389/fpls.2016.00908.

Yamashita, Koichi & Funato, Takashi & Suzuki, Yoichi & Teramachi, Shinya & Doi, Yoshiharu. 2003. Characteristic Interactions between Poly(hydroxybutyrate) Depolymerase and Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Film Studied by a Quartz Crystal Microbalance. Macromolecular Bioscience. 3. 694 - 702. doi : 10.1002/mabi.200300004.

Yi H, Bae KS, Chun J. 2004. Aestuariibacter salexigens gen. nov., sp. nov. and Aestuariibacter halophilus sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of Alteromonas macleodii. Int J Syst Evol Microbiol. Mar;54(Pt 2):571-576. doi: 10.1099/ijs.0.02798-0.

Yuan Y, Bayer PE, Batley J, Edwards D. 2021. Current status of structural variation studies in plants. Plant Biotechnol J. Nov;19(11):2153-2163. doi: 10.1111/pbi.13646.

Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the "Plastisphere": Microbial Communities on Plastic Marine Debris. Environ. Sci. Technol. 47, 7137–7146. doi : 10.1021/es401288x

Ziegler M, Quéré G, Ghiglione JF, Iwankow G, **Barbe V**, Boissin E, Wincker P, Planes S, Voolstra CR. 2018. Status of coral reefs of Upolu (Independent State of Samoa) in the South West Pacific and recommendations to promote resilience and recovery of coastal ecosystems. Mar Pollut Bull. Apr;129(1):392-398. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.02.044.

Annexes

Annexe 1 : Références bibliographiques Valérie (Puzos) Barbe

Articles co-signés avec Justine Jacquin (thésarde encadrée)

1. **Jacquin J**, Callac N, Cheng J, Giraud C, Pujo-Pay M, Conan P, Meistertzheim A-L, **Barbe V**, Bruzaud S, Ghiglione JF. Microbial diversity and activity during the biodegradation in seawater of various substitutes to conventional plastic cotton swabs sticks. Frontiers in Microbiology. 2021 Jul 15;12: 1462. doi: 10.3389/fmicb.2021.604395

2. **Jacquin J**, Cheng J, Odobel C, Pandin C, Conan P, Pujo-Pay M, **Barbe V**, Meistertzheim AL, Ghiglione JF. Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the "Plastisphere". Front Microbiol. 2019 Apr 25;10:865. doi: 10.3389/fmicb.2019.00865.

Autres articles relatifs aux (micro)plastiques

1. Odobel C, Dussud C, Philip L, Derippe G, Lauters M, Eyheraguibel B, Burgaud G, Ter Halle A, Meistertzheim AL, Bruzaud S, **Barbe V**, Ghiglione JF. Bacterial Abundance, Diversity and Activity During Long-Term Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics in Seawater. Front Microbiol. 2021 Nov 18;12:734782. doi: 10.3389/fmicb.2021.734782.

2. Cheng J, Jacquin J, Conan P, Pujo-Pay M, **Barbe V**, George M, Fabre P, Bruzaud S, Ter Halle A, Meistertzheim AL, Ghiglione JF. Relative Influence of Plastic Debris Size and Shape, Chemical Composition and Phytoplankton-Bacteria Interactions in Driving Seawater Plastisphere Abundance, Diversity and Activity. Front Microbiol. 2021 Jan 13;11:610231. doi: 10.3389/fmicb.2020.610231.

Autres articles

1. Canaguier C, Guilbaud R, Denis E, Magdelenat G, Belser C, Istace B, Cruaud C, Wincker P, Le Paslier MC, Faivre-Rampant P, Barbe V. Oxford Nanopore and Bionano Genomics technologies evaluation for plant structural variation detection. BioRxiv 2021. doi: 10.1101/2021.04.16.440130

2. Gauthier J, Boulain H, van Vugt JJFA, Baudry L, Persyn E, Aury JM, Noel B, Bretaudeau A, Legeai F, Warris S, Chebbi MA, Dubreuil G, Duvic B, Kremer N, Gayral P, Musset K, Josse T, Bigot D, Bressac C, Moreau S, Periquet G, Harry M, Montagné N, Boulogne I, Sabeti-Azad M, Maïbèche M, Chertemps T, Hilliou F, Siaussat D, Amselem J, Luyten I, Capdevielle-Dulac C, Labadie K, Merlin BL, **Barbe V**, de Boer JG, Marbouty M, Cônsoli FL, Dupas S, Hua-Van A, Le Goff G, Bézier A, Jacquin-Joly E, Whitfield JB, Vet LEM, Smid HM, Kaiser L, Koszul R, Huguet E, Herniou EA, Drezen

JM. Chromosomal scale assembly of parasitic wasp genome reveals symbiotic virus colonization. Commun Biol. 2021 Jan 22;4(1):104. doi: 10.1038/s42003-020-01623-8.

3. Freel KC, Fouteau S, Roche D, Farasin J, Huber A, Koechler S, Peres M, Chiboub O, Varet H, Proux C, Deschamps J, Briandet R, Torchet R, Cruveiller S, Lièvremont D, Coppée JY, **Barbe V**, Arsène-Ploetze F. Effect of arsenite and growth in biofilm conditions on the evolution of Thiomonas sp. CB2. Microb Genom. 2020 Oct 9; 6(10):mgen000447. doi: 10.1099/mgen.0.000447.

4. Bottai D, Frigui W, Sayes F, Di Luca M, Spadoni D, Pawlik A, Zoppo M, Orgeur M, Khanna V, Hardy D, Mangenot S, **Barbe V**, Medigue C, Ma L, Bouchier C, Tavanti A, Larrouy-Maumus G, Brosch R. TbD1 deletion as a driver of the evolutionary success of modern epidemic Mycobacterium tuberculosis lineages. Nat Commun. 2020 Feb 4;11(1):684. doi: 10.1038/s41467-020-14508-5.

5. Manzano-Marı N A, Coeur d'acier A, Clamens AL, Orvain C, Cruaud C, **Barbe V**, Jousselin E. Serial horizontal transfer of vitamin-biosynthetic genes enables the establishment of new nutritional symbionts in aphids' di-symbiotic systems. ISME J. 2020 Jan;14(1):259-273. doi: 10.1038/s41396-019-0533-6.

6. Planes S, Allemand D, Agostini S, Banaigs B, Boissin E, Boss E, Bourdin G, Bowler C, Douville E, Flores JM, Forcioli D, Furla P, Galand PE, Ghiglione JF, Gilson E, Lombard F, Moulin C, Pesant S, Poulain J, Reynaud S, Romac S, Sullivan MB, Sunagawa S, Thomas OP, Troublé R, de Vargas C, Vega Thurber R, Voolstra CR, Wincker P, Zoccola D; **Tara Pacific Consortium**. The Tara Pacific expedition-A pan-ecosystemic approach of the "-omics" complexity of coral reef holobionts across the Pacific Ocean. PLoS Biol. 2019 Sep 23;17(9):e3000483. doi: 10.1371/journal.pbio.3000483.

7. Branger C, Ledda A, Billard-Pomares T, Doublet B, **Barbe V**, Roche D, Médigue C, Arlet G, Denamur E. Specialization of small non-conjugative plasmids in *Escherichia coli* according to their family types. Microb Genom. 2019 Sep;5(9):e000281. doi: 10.1099/mgen.0.000281.

8. Billard-Pomares T, Clermont O, Castellanos M, Magdoud F, Royer G, Condamine B, Fouteau S, **Barbe V**, Roche D, Cruveiller S, Médigue C, Pognard D, Glodt J, Dion S, Rigal O, Picard B, Denamur E, Branger C. The Arginine Deiminase Operon Is Responsible for a Fitness Trade-Off in Extended-Spectrum-β-Lactamase- Producing Strains of Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother. 2019 Jul 25;63(8):e00635-19. doi: 10.1128/AAC.00635-19.

9. Monteil CL, Vallenet D, Menguy N, Benzerara K, **Barbe V**, Fouteau S, Cruaud C, Floriani M, Viollier E, Adryanczyk G, Leonhardt N, Faivre D, Pignol D, López- García P, Weld RJ, Lefevre CT. Ectosymbiotic bacteria at the origin of magnetoreception in a marine protist. Nat Microbiol. 2019 Jul;4(7):1088-1095. doi: 10.1038/s41564-019-0432-7.

10. Zhang WJ, Cui XH, Chen LH, Yang J, Li XG, Zhang C, **Barbe V**, Mangenot S, Fouteau S, Guerin T, Kato C, Wu LF. Complete genome sequence of Shewanella benthica DB21MT-2, an obligate piezophilic bacterium isolated from the deepest Mariana Trench sediment. Marine Genomics. 2019 Apr; 44: 52-56. doi.org/10.1016/j.margen.2018.09.001

11. Ferreira de Carvalho J, Lucas J, Deniot G, Falentin C, Filangi O, Gilet M, Legeai F, Lode M, Morice J, Trotoux G, Aury JM, **Barbe V**, Keller J, Snowdon R, He Z, Denoeud F, Wincker P, Bancroft I, Chèvre AM, Rousseau-Gueutin M. Cytonuclear interactions remain stable during allopolyploid evolution despite repeated whole-genome duplications in Brassica. Plant J. 2019 May;98(3):434-447. doi: 10.1111/tpj.14228.

12. Belser C, Istace B, Denis E, Dubarry M, Baurens FC, Falentin C, Genete M, Berrabah W, Chèvre AM, Delourme R, Deniot G, Denoeud F, Duffé P, Engelen S, Lemainque A, Manzanares-Dauleux M, Martin G, Morice J, Noel B, Vekemans X, D'Hont A, Rousseau-Gueutin M, **Barbe V**, Cruaud C, Wincker P, Aury JM. Chromosome- scale assemblies of plant genomes using nanopore long reads and optical maps. Nat Plants. 2018 Nov;4(11):879-887. doi: 10.1038/s41477-018-0289-4.

13. Manzano-Marín A, Coeur d'acier A, Clamens AL, Orvain C, Cruaud C, **Barbe V**, Jousselin E. A Freeloader? The Highly Eroded Yet Large Genome of the Serratia symbiotica Symbiont of Cinara strobi. Genome Biol Evol. 2018 Sep 1;10(9):2178-2189. doi: 10.1093/gbe/evy173.

14. De Carli F, Menezes N, Berrabah W, **Barbe V**, Genovesio A, Hyrien O. High-throughput optical mapping of replicating DNA. Small methods. 2018 Sep 11; 2(9): 1800146. doi.org/10.1002/smtd.201800146

15. Ramírez-González RH, Borrill P, ..; **International Wheat Genome Sequencing Consortium**, …, Spannagl M, Bräutigam A, Uauy C. The transcriptional landscape of polyploid wheat. Science. 2018 Aug 17;361(6403):eaar6089. doi: 10.1126/science.aar6089.

16. **International Wheat Genome Sequencing Consortium** (IWGSC); Science. 2018 Aug 17;361(6403):eaar7191. doi: 10.1126/science.aar7191.

17. Chen NWG, Serres-Giardi L, Ruh M, Briand M, Bonneau S, Darrasse A, **Barbe V**, Gagnevin L, Koebnik R, Jacques MA. Horizontal gene transfer plays a major role in the pathological convergence of Xanthomonas lineages on common bean. BMC Genomics. 2018 Aug 13;19(1):606. doi: 10.1186/s12864-018-4975-4.

18. Branger C, Ledda A, Billard-Pomares T, Doublet B, Fouteau S, **Barbe V**, Roche D, Cruveiller S, Médigue C, Castellanos M, Decré D, Drieux-Rouze L, Clermont O, Glodt J, Tenaillon O, Cloeckaert A, Arlet G, Denamur E. Extended-spectrum β-lactamase-encoding genes are spreading on a wide range of Escherichia coli plasmids existing prior to the use of third-generation cephalosporins. Microb Genom. 2018 Sep;4(9):e000203. doi: 10.1099/mgen.0.000203.

19. Plomion C, Aury JM, Amselem J, …, **Barbe V**,…, Wincker P, Quesneville H, Kremer A, Salse J. Oak genome reveals facets of long lifespan. Version 2. Nat Plants. 2018 Jul;4(7):440-452. doi: 10.1038/s41477-018-0172-3.

20. Opatovsky I, Santos-Garcia D, Ruan Z, Lahav T, Ofaim S, Mouton L, **Barbe V**, Jiang J, Zchori-Fein E, Freilich S. Modeling trophic dependencies and exchanges among insects' bacterial symbionts in a host-simulated environment. BMC Genomics. 2018 May 25;19(1):402. doi: 10.1186/s12864-018-4786-7.

21. Denis E, Sanchez S, Mairey B, Beluche O, Cruaud C, Lemainque A, Wincker P, **Barbe V.** Extracting high molecular weight genomic DNA from Saccharomyces cerevisiae. Research Square (Protocole exchange) 2018 Jun 12. doi:10.1038/protex.2018.076

22. Ziegler M, Quéré G, Ghiglione JF, Iwankow G, **Barbe V**, Boissin E, Wincker P, Planes S, Voolstra CR. Status of coral reefs of Upolu (Independent State of Samoa) in the South West Pacific and recommendations to promote resilience and recovery of coastal ecosystems. Mar Pollut Bull. 2018 Apr;129(1):392-398. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.02.044.

23. Dias GM, Bidault A, Le Chevalier P, Choquet G, Der Sarkissian C, Orlando L, Medigue C, **Barbe V**, Mangenot S, Thompson CC, Thompson FL, Jacq A, Pichereau V, Paillard C. *Vibrio tapetis* Displays an Original Type IV Secretion System in Strains Pathogenic for Bivalve Molluscs. Front Microbiol. 2018 Feb 19;9:227. doi: 10.3389/fmicb.2018.00227.

24. Arsène-Ploetze F, Chiboub O, Lièvremont D, Farasin J, Freel KC, Fouteau S, **Barbe V**. Correction to: Adaptation in toxic environments: comparative genomics of loci carrying antibiotic resistance genes derived from acid mine drainage waters. Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Jan;25(2):1484-1485. doi:10.1007/s11356-017-0803-7. Erratum for: Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Jan;25(2):1470-1483.

25. Lassalle F, Planel R, Penel S, Chapulliot D, **Barbe V**, Dubost A, Calteau A, Vallenet D, Mornico D, Bigot T, Guéguen L, Vial L, Muller D, Daubin V, Nesme X. Ancestral Genome Estimation Reveals the History of Ecological Diversification in Agrobacterium. Genome Biol Evol. 2017 Dec 1;9(12):3413-3431. doi: 10.1093/gbe/evx255.

26. Fouteau S, Guerin T, Magdelenat G, Roumagnac M, Bartoli M, Ollivier B, Dolla A, **Barbe V**, Pradel N. Genome Sequence of Piezophilic Bacterium *Desulfovibrio Profundus* Strain 500-1, Isolated from a Deep Sediment Layer in the Japan Sea. Genome Announc. 2017 Nov 2;5(44):e01181-17. doi: 10.1128/genomeA.01181-17.

27. Arsène-Ploetze F, Chiboub O, Lièvremont D, Farasin J, Freel KC, Fouteau S, **Barbe V**. Adaptation in toxic environments: comparative genomics of loci carrying antibiotic resistance genes derived from acid mine drainage waters. Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Jan;25(2):1470-1483. doi: 10.1007/s11356-017-0535-8.

28. Bringel F, Postema CP, Mangenot S, Bibi-Triki S, Chaignaud P, Farhan Ul Haque M, Gruffaz C, Hermon L, Louhichi Y, Maucourt B, Muller EEL, Nadalig T, Lajus A, Rouy Z, Médigue C, **Barbe V**, Janssen DB, Vuilleumier S. Genome Sequence of the Dichloromethane-Degrading *Bacterium Hyphomicrobium* sp. Strain GJ21. Genome Announc. 2017 Jul 27;5(30):e00622-17. doi: 10.1128/genomeA.00622-17.

29. Cossu M, Badel C, Catchpole R, Gadelle D, Marguet E, **Barbe V**, Forterre P, Oberto J. Flipping chromosomes in deep-sea archaea. PLoS Genet. 2017 Jun 19;13(6):e1006847. doi: 10.1371/journal.pgen.1006847.

30. Ji B, Zhang SD, Zhang WJ, Rouy Z, Alberto F, Santini CL, Mangenot S, Gagnot S, Philippe N, Pradel N, Zhang L, Tempel S, Li Y, Médigue C, Henrissat B, Coutinho PM, **Barbe V**, Talla E, Wu LF. The chimeric nature of the genomes of marine magnetotactic coccoid-ovoid bacteria defines a novel group of Proteobacteria. Environ Microbiol. 2017 Mar;19(3):1103-1119. doi: 10.1111/1462-2920.13637.

31. Pancrace C, Barny MA, Ueoka R, Calteau A, Scalvenzi T, Pédron J, **Barbe V**, Piel J, Humbert JF, Gugger M. Insights into the Planktothrix genus: Genomic and metabolic comparison of benthic and planktic strains. Sci Rep. 2017 Jan 24;7:41181. doi: 10.1038/srep41181.

32. Arrigoni R, Vacherie B, Benzoni F, Stefani F, Karsenti E, Jaillon O, Not F, Nunes F, Payri C, Wincker P, **Barbe V**. A new sequence data set of SSU rRNA gene for Scleractinia and its phylogenetic and ecological applications. Mol Ecol Resour. 2017 Sep;17(5):1054-1071. doi: 10.1111/1755-0998.12640.

33. Chaussonnerie S, Saaidi PL, Ugarte E, Barbance A, Fossey A, **Barbe V**, Gyapay G, Brüls T, Chevallier M, Couturat L, Fouteau S, Muselet D, Pateau E, Cohen GN, Fonknechten N, Weissenbach J, Le Paslier D. Microbial Degradation of a Recalcitrant Pesticide: Chlordecone. Front Microbiol. 2016 Dec 20;7:2025. doi: 10.3389/fmicb.2016.02025.

34. Barbeyron T, Thomas F, **Barbe V**, Teeling H, Schenowitz C, Dossat C, Goesmann A, Leblanc C, Oliver Glöckner F, Czjzek M, Amann R, Michel G. Habitat and taxon as driving forces of carbohydrate catabolism in marine heterotrophic bacteria: example of the model algae-associated bacterium Zobellia galactanivorans Dsij T . Environ Microbiol. 2016 Dec;18(12):4610-4627. doi: 10.1111/1462-2920.13584.

35. Bennke CM, Krüger K, Kappelmann L, Huang S, Gobet A, Schüler M, **Barbe V**, Fuchs BM, Michel G, Teeling H, Amann RI. Polysaccharide utilisation loci of Bacteroidetes from two contrasting open ocean sites in the North Atlantic. Environ Microbiol. 2016 Dec;18(12):4456-4470. doi: 10.1111/1462-2920.13429.

36. Lebrigand K, He LD, Thakur N, Arguel MJ, Polanowska J, Henrissat B, Record E, Magdelenat G, **Barbe V**, Raffaele S, Barbry P, Ewbank JJ. Comparative Genomic Analysis of Drechmeria coniospora Reveals Core and Specific Genetic Requirements for Fungal Endoparasitism of Nematodes. PLoS Genet. 2016 May 6;12(5):e1006017. doi: 10.1371/journal.pgen.1006017.

37. Belda E, van Heck RG, José Lopez-Sanchez M, Cruveiller S, **Barbe V**, Fraser C, Klenk HP, Petersen J, Morgat A, Nikel PI, Vallenet D, Rouy Z, Sekowska A, Martins Dos Santos VA, de Lorenzo V, Danchin A, Médigue C. The revisited genome of Pseudomonas putida KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. Environ Microbiol. 2016 Oct;18(10):3403-3424. doi: 10.1111/1462-2920.13230.

38. Gourgues G, Barré A, Beaudoing E, Weber J, Magdelenat G, **Barbe V**, Schieck E, Jores J, Vashee S, Blanchard A, Lartigue C, Sirand-Pugnet P. Complete Genome Sequence of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides T1/44, a Vaccine Strain against Contagious Bovine Pleuropneumonia. Genome Announc. 2016 Apr 14;4(2):e00263-16. doi: 10.1128/genomeA.00263-16.

39. Zhang SD, Santini CL, Zhang WJ, **Barbe V**, Mangenot S, Guyomar C, Garel M, Chen HT, Li XG, Yin QJ, Zhao Y, Armengaud J, Gaillard JC, Martini S, Pradel N, Vidaud C, Alberto F, Médigue C, Tamburini C, Wu LF. Genomic and physiological analysis reveals versatile metabolic capacity of deep-sea Photobacterium phosphoreum ANT-2200. Extremophiles. 2016 May;20(3):301-10. doi: 10.1007/s00792-016-0822-1.

40. Falentin H, Deutsch SM, Loux V, Hammani A, Buratti J, Parayre S, Chuat V, **Barbe V**, Aury JM, Jan G, Le Loir Y. Permanent draft genome sequence of the probiotic strain Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 129 (ITG P20). Stand Genomic Sci. 2016 Jan 14;11:6. doi: 10.1186/s40793-015-0120-z.

41. Pichon A, Bézier A, **Barbe V**, Drezen JM, Volkoff AN. Les guêpes parasites ont domestiqué des virus à plusieurs reprises au cours de leur évolution [Parasitic wasps have hijacked viruses several times during their evolution]. Med Sci (Paris). 2016 8-9;32(8-9):699-703. French. doi: 10.1051/medsci/20163208013.

42. Gordon JL, Lefeuvre P, Escalon A, **Barbe V**, Cruveiller S, Gagnevin L, Pruvost O. Comparative genomics of 43 strains of Xanthomonas citri pv. citri reveals the evolutionary events giving rise to pathotypes with different host ranges. BMC Genomics. 2015 Dec 23;16:1098. doi: 10.1186/s12864-015-2310-x.

43. Pichon A, Bézier A, Urbach S, Aury JM, Jouan V, Ravallec M, Guy J, Cousserans F, Thézé J, Gauthier J, Demettre E, Schmieder S, Wurmser F, Sibut V, Poirié M, Colinet D, da Silva C, Couloux A, **Barbe V**, Drezen JM, Volkoff AN. Recurrent DNA virus domestication leading to different parasite virulence strategies. Sci Adv. 2015 Nov 27;1(10):e1501150. doi: 10.1126/sciadv.1501150.

44. Freel KC, Krueger MC, Farasin J, Brochier-Armanet C, **Barbe V**, Andrès J, Cholley PE, Dillies MA, Jagla B, Koechler S, Leva Y, Magdelenat G, Plewniak F, Proux C, Coppée JY, Bertin PN, Heipieper HJ, Arsène-Ploetze F. Adaptation in Toxic Environments: Arsenic Genomic Islands in the Bacterial Genus Thiomonas. PLoS One. 2015 Sep 30;10(9):e0139011. doi: 10.1371/journal.pone.0139011.

45. Farasin J, Andres J, Casiot C, **Barbe V**, Faerber J, Halter D, Heintz D, Koechler S, Lièvremont D, Lugan R, Marchal M, Plewniak F, Seby F, Bertin PN, Arsène-Ploetze F. Thiomonas sp. CB2 is able to degrade urea and promote toxic metal precipitation in acid mine drainage waters supplemented with urea. Front Microbiol. 2015 Sep 28;6:993. doi: 10.3389/fmicb.2015.00993.

46. Sayavedra L, Kleiner M, Ponnudurai R, Wetzel S, Pelletier E, **Barbe V**, Satoh N, Shoguchi E, Fink D, Breusing C, Reusch TB, Rosenstiel P, Schilhabel MB, Becher D, Schweder T, Markert S, Dubilier N, Petersen JM. Abundant toxin-related genes in the genomes of beneficial symbionts from deep-sea hydrothermal vent mussels. Elife. 2015 Sep 15;4:e07966. doi: 10.7554/eLife.07966.

47. Chateigner A, Bézier A, Labrousse C, Jiolle D, **Barbe V**, Herniou EA. Ultra Deep Sequencing of a Baculovirus Population Reveals Widespread Genomic Variations. Viruses. 2015 Jul 7;7(7):3625-46. doi: 10.3390/v7072788.

48. Galimand M, Fishovitz J, Lambert T, **Barbe V**, Zajicek J, Mobashery S, Courvalin P. AAC(3)-XI, a new aminoglycoside 3-N-acetyltransferase from Corynebacterium striatum. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Sep;59(9):5647-53. doi: 10.1128/AAC.01203-15.

49. Labadie K, Alberti A, Briñas L, Orvain C, Belser C, Cruaud C, Bertrand L, **Barbe V**, Aury JM, Wincker P. BAC ends library generation for Illumina sequencing. Protocol exchange 2015 June. doi: 10.1038/protex.2015.048.

50. Plomion C, Aury JM, Amselem J, Alaeitabar T, **Barbe V**, …, Faivre-Rampant P, Wincker P, Salse J, Quesneville H, Kremer A. Decoding the oak genome: public release of sequence data, assembly, annotation and publication strategies. Mol Ecol Resour. 2016 Jan;16(1):254-65. doi: 10.1111/1755-0998.12425.

51. Loux V, Mariadassou M, Almeida S, Chiapello H, Hammani A, Buratti J, Gendrault A, **Barbe V**, Aury JM, Deutsch SM, Parayre S, Madec MN, Chuat V, Jan G, Peterlongo P, Azevedo V, Le Loir Y, Falentin H. Mutations and genomic islands can explain the strain dependency of sugar utilization in 21 strains of Propionibacterium freudenreichii. BMC Genomics. 2015 Apr 15;16(1):296. doi: 10.1186/s12864-015-1467-7.

52. Pieretti I, Bolot S, Carrère S, **Barbe V**, Cociancich S, Rott P, Royer M. Draft Genome Sequence of Xanthomonas sacchari Strain LMG 476. Genome Announc. 2015 Mar 19;3(2):e00146-15. doi: 10.1128/genomeA.00146-15.

53. Rollat-Farnier PA, Santos-Garcia D, Rao Q, Sagot MF, Silva FJ, Henri H, Zchori-Fein E, Latorre A, Moya A, **Barbe V**, Liu SS, Wang XW, Vavre F, Mouton L. Two host clades, two bacterial arsenals: evolution through gene losses in facultative endosymbionts. Genome Biol Evol. 2015 Feb 20;7(3):839-55. doi: 10.1093/gbe/evv030.

54. Fontanillas E, Hood ME, Badouin H, Petit E, **Barbe V**, Gouzy J, de Vienne DM, Aguileta G, Poulain J, Wincker P, Chen Z, Toh SS, Cuomo CA, Perlin MH, Gladieux P, Giraud T. Degeneration of the nonrecombining regions in the mating-type chromosomes of the anther-smut fungi. Mol Biol Evol. 2015 Apr;32(4):928-43. doi: 10.1093/molbev/msu396.

55. Ivshina IB, Kuyukina MS, Krivoruchko AV, **Barbe V**, Fischer C. Draft Genome Sequence of Propane- and Butane-Oxidizing Actinobacterium Rhodococcus ruber IEGM 231. Genome Announc. 2014 Dec 11;2(6):e01297-14. doi: 10.1128/genomeA.01297-14.

56. Grandaubert J, Lowe RG, Soyer JL, Schoch CL, Van de Wouw AP, Fudal I, Robbertse B, Lapalu N, Links MG, Ollivier B, Linglin J, **Barbe V**, Mangenot S, Cruaud C, Borhan H, Howlett BJ, Balesdent MH, Rouxel T. Transposable element- assisted evolution and adaptation to host plant within the Leptosphaeria maculans-Leptosphaeria biglobosa species complex of fungal pathogens. BMC Genomics. 2014 Oct 12;15:891. doi: 10.1186/1471-2164-15-891.

57. Talla E, Hedrich S, Mangenot S, Ji B, Johnson DB, **Barbe V**, Bonnefoy V. Insights into the pathways of iron- and sulfur-oxidation, and biofilm formation from the chemolithotrophic acidophile Acidithiobacillus ferrivorans CF27. Res Microbiol. 2014 Nov;165(9):753-60. doi: 10.1016/j.resmic.2014.08.002.

58. Billard-Pomares T, Fouteau S, Jacquet ME, Roche D, **Barbe V**, Castellanos M, Bouet JY, Cruveiller S, Médigue C, Blanco J, Clermont O, Denamur E, Branger C. Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum β-lactamase from an Escherichia coli strain. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Nov;58(11):6550-7. doi: 10.1128/AAC.03183-14.

59. **International Wheat Genome Sequencing Consortium** (IWGSC). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (Triticum aestivum) genome. Science. 2014 Jul 18;345(6194):1251788. doi: 10.1126/science.1251788.

60. Marcussen T, Sandve SR, Heier L, Spannagl M, Pfeifer M**; International Wheat Genome Sequencing Consortium,**, Jakobsen KS, Wulff BB, Steuernagel B, Mayer KF, Olsen OA. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. Science. 2014 Jul 18;345(6194):1250092. doi: 10.1126/science.1250092.

61. Pfeifer M, Kugler KG, Sandve SR, Zhan B, Rudi H, Hvidsten TR; **International Wheat Genome Sequencing Consortium**, Mayer KF, Olsen OA. Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat. Science. 2014 Jul 18;345(6194):1250091. doi: 10.1126/science.1250091.

62. Choulet F, Alberti A, Theil S, Glover N, **Barbe V**, …,Quesneville H, Wincker P, Feuillet C. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. Science. 2014 Jul 18;345(6194):1249721. doi:10.1126/science.1249721.

63. Arrigoni R, Vacherie B, Benzoni F, **Barbe V**. The complete mitochondrial genome of Acanthastrea maxima (Cnidaria, Scleractinia, Lobophylliidae). Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. 2016;27(2):927-8. doi: 10.3109/19401736.2014.926489.

64. Lery LM, Frangeul L, Tomas A, Passet V, Almeida AS, Bialek-Davenet S, **Barbe V**, Bengoechea JA, Sansonetti P, Brisse S, Tournebize R. Comparative analysis of Klebsiella pneumoniae genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. BMC Biol. 2014 May 29;12:41. doi: 10.1186/1741-7007-12-41.

65. Kunze G, Gaillardin C, Czernicka M, …, **Barbe V**, …, Dujon B, Souciet JL, Wincker P, Scholz U, Neuvéglise C. The complete genome of Blastobotrys (Arxula) adeninivorans LS3 - a yeast of biotechnological interest. Biotechnol Biofuels. 2014 Apr 24;7:66. doi: 10.1186/1754-6834-7-66.

66. Zhang SD, **Barbe V**, Garel M, Zhang WJ, Chen H, Santini CL, Murat D, Jing H, Zhao Y, Lajus A, Martini S, Pradel N, Tamburini C, Wu LF. Genome Sequence of Luminous Piezophile Photobacterium phosphoreum ANT-2200. Genome Announc. 2014 Apr 17;2(2):e00096-14. doi: 10.1128/genomeA.00096-14.

67. Val ME, Kennedy SP, Soler-Bistué AJ, **Barbe V**, Bouchier C, Ducos-Galand M, Skovgaard O, Mazel D. Fuse or die: how to survive the loss of Dam in Vibrio cholerae. Mol Microbiol. 2014 Feb;91(4):665-78. doi: 10.1111/mmi.12483.

68. Daron J, Glover N, Pingault L, Theil S, Jamilloux V, Paux E, **Barbe V**, Mangenot S, Alberti A, Wincker P, Quesneville H, Feuillet C, Choulet F. Organization and evolution of transposable

elements along the bread wheat chromosome 3B. Genome Biol. 2014;15(12):546. doi: 10.1186/s13059-014-0546-4.

69. Gilbert C, Chateigner A, Ernenwein L, **Barbe V**, Bézier A, Herniou EA, Cordaux R. Population genomics supports baculoviruses as vectors of horizontal transfer of insect transposons. Nat Commun. 2014;5:3348. doi: 10.1038/ncomms4348.

70. Darrasse A, Carrère S, **Barbe V**, …, Verdier V, Vernière C, Arlat M, Manceau C, Jacques MA. Genome sequence of Xanthomonas fuscans subsp. fuscans strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. BMC Genomics. 2013 Nov 6;14:761. doi: 10.1186/1471-2164-14-761.

71. Koechler S, Plewniak F, **Barbe V**, Battaglia-Brunet F, Jost B, Joulian C, Philipps M, Vicaire S, Vincent S, Ye T, Bertin PN. Genome Sequence of Halomonas sp. Strain A3H3, Isolated from Arsenic-Rich Marine Sediments. Genome Announc. 2013 Oct 10;1(5):e00819-13. doi: 10.1128/genomeA.00819-13.

72. Volff JN, Selz Y, Hoffmann C, Froschauer A, Schultheis C, Schmidt C, Zhou Q, Bernhardt W, Hanel R, Böhne A, Brunet F, Ségurens B, Couloux A, Bernard-Samain S, **Barbe V**, Ozouf-Costaz C, Galiana D, Lohse MJ, Schartl M. Gene amplification and functional diversification of melanocortin 4 receptor at an extremely polymorphic locus controlling sexual maturation in the platyfish. Genetics. 2013 Dec;195(4):1337-52. doi: 10.1534/genetics.113.155952.

73. Royer M, Koebnik R, Marguerettaz M, **Barbe V**, Robin GP, Brin C, Carrere S, Gomez C, Hügelland M, Völler GH, Noëll J, Pieretti I, Rausch S, Verdier V, Poussier S, Rott P, Süssmuth RD, Cociancich S. Genome mining reveals the genus Xanthomonas to be a promising reservoir for new bioactive non-ribosomally synthesized peptides. BMC Genomics. 2013 Sep 27;14:658. doi: 10.1186/1471-2164-14-658.

74. Humbert JF, **Barbe V**, Latifi A, Gugger M, Calteau A, Coursin T, Lajus A, Castelli V, Oztas S, Samson G, Longin C, Medigue C, de Marsac NT. A tribute to disorder in the genome of the bloom-forming freshwater cyanobacterium Microcystis aeruginosa. PLoS One. 2013 Aug 12;8(8):e70747. doi: 10.1371/journal.pone.0070747.

75. Flot JF, Hespeels B, Li X, Noel B, …, **Barbe V**, …, Weissenbach J, Wincker P, Jaillon O, Van Doninck K. Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer Adineta vaga. Nature. 2013 Aug 22;500(7463):453-7. doi: 10.1038/nature12326.

76. Ji B, Zhang SD, Arnoux P, Rouy Z, …, **Barbe V**, Pignol D, Talla E, Wu LF. Comparative genomic analysis provides insights into the evolution and niche adaptation of marine Magnetospira sp. QH-2 strain. Environ Microbiol. 2014 Feb;16(2):525-44. doi: 10.1111/1462-2920.12180.

77. Santini S, Jeudy S, Bartoli J, Poirot O, Lescot M, Abergel C, **Barbe V**, Wommack KE, Noordeloos AA, Brussaard CP, Claverie JM. Genome of Phaeocystis globosa virus PgV-16T highlights the common ancestry of the largest known DNA viruses infecting eukaryotes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jun 25;110(26):10800-5. doi: 10.1073/pnas.1303251110.

78. Chabannes M, Baurens FC, Duroy PO, Bocs S, Vernerey MS, Rodier-Goud M, **Barbe V** , Gayral P, Iskra-Caruana ML. Three infectious viral species lying in wait in the banana genome. J Virol. 2013 Aug;87(15):8624-37. doi: 10.1128/JVI.00899-13.

79. Zoropogui A, Pujic P, Normand P, **Barbe V**, Belli P, Graindorge A, Roche D, Vallenet D, Mangenot S, Boiron P, Rodriguez-Nava V, Ribun S, Richard Y, Cournoyer B, Blaha D. The Nocardia cyriacigeorgica GUH-2 genome shows ongoing adaptation of an environmental Actinobacteria to a pathogen's lifestyle. BMC Genomics. 2013 Apr 27;14:286. doi: 10.1186/1471-2164-14-286.

80. Rosinski-Chupin I, Sauvage E, Mairey B, Mangenot S, Ma L, Da Cunha V, Rusniok C, Bouchier C, **Barbe V**, Glaser P. Reductive evolution in Streptococcus agalactiae and the emergence of a host adapted lineage. BMC Genomics. 2013 Apr 15;14:252. doi: 10.1186/1471-2164-14-252.

81. Steunou AS, Liotenberg S, Soler MN, Briandet R, **Barbe V**, Astier C, Ouchane S. EmbRS a new two-component system that inhibits biofilm formation and saves Rubrivivax gelatinosus from sinking. Microbiologyopen. 2013 Jun;2(3):431-46. doi: 10.1002/mbo3.82.

82. Supply P, Marceau M, Mangenot S, …, **Barbe V**, …, Médigue C, Parkhill J, Cruveiller S, Brosch R. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of Mycobacterium tuberculosis. Nat Genet. 2013 Feb;45(2):172-9. doi: 10.1038/ng.2517.

83. Morales L, Noel B, Porcel B, Marcet-Houben M, Hullo MF, Sacerdot C, Tekaia F, Leh-Louis V, Despons L, Khanna V, Aury JM, **Barbe V**, Couloux A, Labadie K, Pelletier E, Souciet JL, Boekhout T, Gabaldon T, Wincker P, Dujon B. Complete DNA sequence of Kuraishia capsulata illustrates novel genomic features among budding yeasts (Saccharomycotina). Genome Biol Evol. 2013;5(12):2524-39. doi: 10.1093/gbe/evt201.

84. Jancek S, Bézier A, Gayral P, Paillusson C, Kaiser L, Dupas S, Le Ru BP, **Barbe V**, Periquet G, Drezen JM, Herniou EA. Adaptive selection on bracovirus genomes drives the specialization of Cotesia parasitoid wasps. PLoS One. 2013 May 28;8(5):e64432. doi: 10.1371/journal.pone.0064432.

85. Andres J, Arsène-Ploetze F, **Barbe V**, Brochier-Armanet C, Cleiss-Arnold J, Coppée JY, Dillies MA, Geist L, Joublin A, Koechler S, Lassalle F, Marchal M, Médigue C, Muller D, Nesme X, Plewniak F, Proux C, Ramírez-Bahena MH, Schenowitz C, Sismeiro O, Vallenet D, Santini JM, Bertin PN. Life in an arsenic-containing gold mine: genome and physiology of the autotrophic arsenite-oxidizing bacterium rhizobium sp. NT-26. Genome Biol Evol. 2013;5(5):934-53. doi: 10.1093/gbe/evt061.

86. Ji B, Gimenez G, **Barbe V**, Vacherie B, Rouy Z, Amrani A, Fardeau ML, Bertin P, Alazard D, Leroy S, Talla E, Ollivier B, Dolla A, Pradel N. Complete Genome Sequence of the Piezophilic, Mesophilic, Sulfate-Reducing Bacterium Desulfovibrio hydrothermalis AM13(T.). Genome Announc. 2013 Jan;1(1):e00226-12. doi: 10.1128/genomeA.00226-12.

87. Ollivier B, Bertin PN, Dolla A. Genome Sequence of the Sulfate-Reducing Bacterium Amin O, Fardeau ML, Valette O, Hirschler-Réa A, **Barbe V**, Médigue C, Vacherie B, Desulfotomaculum hydrothermale Lam5(T). Genome Announc. 2013 Jan;1(1):e00114-12. doi: 10.1128/genomeA.00114-12.

88. Bolot S, Guy E, Carrere S, **Barbe V**, Arlat M, Noël LD. Genome Sequence of Xanthomonas campestris pv. campestris Strain Xca5. Genome Announc. 2013 Jan;1(1):e00032-12. doi: 10.1128/genomeA.00032-12.

89. Pradel N, Ji B, Gimenez G, Talla E, Lenoble P, Garel M, Tamburini C, Fourquet P, Lebrun R, Bertin P, Denis Y, Pophillat M, **Barbe V**, Ollivier B, Dolla A. The first genomic and proteomic characterization of a deep-sea sulfate reducer: insights into the piezophilic lifestyle of Desulfovibrio piezophilus. PLoS One. 2013;8(1):e55130. doi: 10.1371/journal.pone.0055130.

90. Amin O, Fardeau ML, Valette O, Hirschler-Réa A, **Barbe V**, Médigue C, Vacherie B, Ollivier B, Bertin PN, Dolla A. Genome Sequence of the Sulfate-Reducing Bacterium Desulfotomaculum hydrothermale Lam5T. Genome Announcements. 2013 jan;1(1):e00114-12. doi.org/10.1128/genomeA.00114-12

91. Pieretti I, Royer M, **Barbe V**, Carrere S, Koebnik R, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques MA, Lauber E, Manceau C, Mangenot S, Poussier S, Segurens B, Szurek B, Verdier V, Arlat M, Gabriel DW, Rott P, Cociancich S. Genomic insights into strategies used by Xanthomonas albilineans with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. BMC Genomics. 2012 Nov 21;13:658. doi: 10.1186/1471-2164-13-658.

92. Diene SM, Merhej V, Henry M, El Filali A, Roux V, Robert C, Azza S, Gavory F, **Barbe V**, La Scola B, Raoult D, Rolain JM. The rhizome of the multidrug- resistant Enterobacter aerogenes genome reveals how new "killer bugs" are created because of a sympatric lifestyle. Mol Biol Evol. 2013 Feb;30(2):369-83. doi: 10.1093/molbev/mss236.

93. Wisniewski-Dyé F, Lozano L, Acosta-Cruz E, Borland S, Drogue B, Prigent- Combaret C, Rouy Z, **Barbe V**, Herrera AM, González V, Mavingui P. Genome Sequence of Azospirillum brasilense CBG497 and Comparative Analyses of Azospirillum Core and Accessory Genomes provide Insight into Niche Adaptation. Genes (Basel). 2012 Sep 28;3(4):576-602. doi: 10.3390/genes3040576.

94. Normand P, Gury J, Pujic P, Chouaia B, Crotti E, Brusetti L, Daffonchio D, Vacherie B, **Barbe V**, Médigue C, Calteau A, Ghodhbane-Gtari F, Essoussi I, Nouioui I, Abbassi-Ghozzi I, Gtari M. Genome sequence of radiation-resistant Modestobacter marinus strain BC501, a representative actinobacterium that thrives on calcareous stone surfaces. J Bacteriol. 2012 Sep;194(17):4773-4. doi: 10.1128/JB.01029-12.

95. Cornillot E, Hadj-Kaddour K, Dassouli A, Noel B, Ranwez V, Vacherie B, Augagneur Y, Brès V, Duclos A, Randazzo S, Carcy B, Debierre-Grockiego F, Delbecq S, Moubri-Ménage K, Shams-Eldin H, Usmani-Brown S, Bringaud F, Wincker P, Vivarès CP, Schwarz RT, Schetters TP, Krause PJ, Gorenflot A, Berry V, **Barbe V**, Ben Mamoun C. Sequencing of the smallest Apicomplexan genome from the human pathogen Babesia microti. Nucleic Acids Res. 2012 Oct;40(18):9102-14. doi: 10.1093/nar/gks700.

96. Grimaud R, Ghiglione JF, Cagnon C, Lauga B, Vaysse PJ, Rodriguez-Blanco A, Mangenot S, Cruveiller S, **Barbe V**, Duran R, Wu LF, Talla E, Bonin P, Michotey V. Genome sequence of the marine bacterium Marinobacter hydrocarbonoclasticus SP17, which forms biofilms on

hydrophobic organic compounds. J Bacteriol. 2012 Jul;194(13):3539-40. doi: 10.1128/JB.00500-12.

97. Chouaia B, Crotti E, Brusetti L, Daffonchio D, Essoussi I, Nouioui I, Sbissi I, Ghodhbane-Gtari F, Gtari M, Vacherie B, **Barbe V**, Médigue C, Gury J, Pujic P, Normand P. Genome sequence of Blastococcus saxobsidens DD2, a stone-inhabiting bacterium. J Bacteriol. 2012 May;194(10):2752-3. doi: 10.1128/JB.00320-12.

98. Acosta-Cruz E, Wisniewski-Dyé F, Rouy Z, **Barbe V**, Valdés M, Mavingui P. Insights into the 1.59-Mbp largest plasmid of Azospirillum brasilense CBG497. Arch Microbiol. 2012 Sep;194(9):725-36. doi: 10.1007/s00203-012-0805-2.

99. Zoropogui A, Pujic P, Normand P, **Barbe V**, Beaman B, Beaman L, Boiron P, Colinon C, Deredjian A, Graindorge A, Mangenot S, Nazaret S, Neto M, Petit S, Roche D, Vallenet D, Rodríguez-Nava V, Richard Y, Cournoyer B, Blaha D. Genome sequence of the human- and animal-pathogenic strain Nocardia cyriacigeorgica GUH-2. J Bacteriol. 2012 Apr;194(8):2098-9. doi: 10.1128/JB.00161-12.

100. Mavingui P, Valiente Moro C, Tran-Van V, Wisniewski-Dyé F, Raquin V, Minard G, Tran FH, Voronin D, Rouy Z, Bustos P, Lozano L, **Barbe V**, González V. Whole-genome sequence of Wolbachia strain wAlbB, an endosymbiont of tiger mosquito vector Aedes albopictus. J Bacteriol. 2012 Apr;194(7):1840. doi: 10.1128/JB.00036-12.

101. Louis VL, Despons L, Friedrich A, …, **Barbe V**, …, Wincker P, Gaillardin C, Dujon B, Souciet JL. Pichia sorbitophila, an Interspecies Yeast Hybrid, Reveals Early Steps of Genome Resolution After Polyploidization. G3 (Bethesda). 2012 Feb;2(2):299-311. doi: 10.1534/g3.111.000745.

102. Dupuy V, Manso-Silván L, **Barbe V**, Thebault P, Dordet-Frisoni E, Citti C, Poumarat F, Blanchard A, Breton M, Sirand-Pugnet P, Thiaucourt F. Evolutionary history of contagious bovine pleuropneumonia using next generation sequencing of Mycoplasma mycoides Subsp. mycoides "Small Colony". PLoS One. 2012;7(10):e46821. doi: 10.1371/journal.pone.0046821.

103. Vuilleumier S, Khmelenina VN, Bringel F, Reshetnikov AS, Lajus A, Mangenot S, Rouy Z, Op den Camp HJ, Jetten MS, Dispirito AA, Dunfield P, Klotz MG, Semrau JD, Stein LY, **Barbe V**, Médigue C, Trotsenko YA, Kalyuzhnaya MG. Genome sequence of the haloalkaliphilic methanotrophic bacterium Methylomicrobium alcaliphilum 20Z. J Bacteriol. 2012 Jan;194(2):551-2. doi: 10.1128/JB.06392-11.

104. Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov LO, Wuichet K, Hurst GB, McDonald WH, Robertson JS, **Barbe V**, Calteau A, Rouy Z, Mangenot S, Prigent-Combaret C, Normand P, Boyer M, Siguier P, Dessaux Y, Elmerich C, Condemine G, Krishnen G, Kennedy I, Paterson AH, González V, Mavingui P, Zhulin IB. Azospirillum genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. PLoS Genet. 2011 Dec;7(12):e1002430. doi: 10.1371/journal.pgen.1002430.

105. Young ND, Debellé F, Oldroyd GE, …, **Barbe V**, …, Quétier F, Town CD, Roe BA. The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. Nature. 2011 Nov 16;480(7378):520-4. doi: 10.1038/nature10625.

106. Gomez-Valero L, Rusniok C, Jarraud S, Vacherie B, Rouy Z, **Barbe V**, Medigue C, Etienne J, Buchrieser C. Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the Legionella pneumophila genomes. BMC Genomics. 2011 Nov 1;12:536. doi: 10.1186/1471-2164-12-536.

107. Zhang Z, Belcram H, Gornicki P, Charles M, Just J, Huneau C, Magdelenat G, Couloux A, Samain S, Gill BS, Rasmussen JB, **Barbe V**, Faris JD, Chalhoub B. Duplication and partitioning in evolution and function of homoeologous Q loci governing domestication characters in polyploid wheat. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Nov 15;108(46):18737-42. doi: 10.1073/pnas.1110552108. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 24;109(4):1353.

108. Touchon M, Barbier P, Bernardet JF, Loux V, Vacherie B, **Barbe V**, Rocha EP, Duchaud E. Complete genome sequence of the fish pathogen Flavobacterium branchiophilum. Appl Environ Microbiol. 2011 Nov;77(21):7656-62. doi: 10.1128/AEM.05625-11.

109. Pujol A, Crost EH, Simon G, **Barbe V**, Vallenet D, Gomez A, Fons M. Characterization and distribution of the gene cluster encoding RumC, an anti- Clostridium perfringens bacteriocin produced in the gut. FEMS Microbiol Ecol. 2011 Nov;78(2):405-15. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01176.x.

110. Gómez-Pereira PR, Schüler M, Fuchs BM, Bennke C, Teeling H, Waldmann J, Richter M, **Barbe V**, Bataille E, Glöckner FO, Amann R. Genomic content of uncultured Bacteroidetes from contrasting oceanic provinces in the North Atlantic Ocean. Environ Microbiol. 2012 Jan;14(1):52-66. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02555.x.

111. **Barbe V**, Bouzon M, Mangenot S, Badet B, Poulain J, Segurens B, Vallenet D, Marlière P, Weissenbach J. Complete genome sequence of Streptomyces cattleya NRRL 8057, a producer of antibiotics and fluorometabolites. J Bacteriol. 2011 Sep;193(18):5055-6. doi: 10.1128/JB.05583-11.

112. Vuilleumier S, Nadalig T, Ul Haque MF, Magdelenat G, Lajus A, Roselli S, Muller EE, Gruffaz C, **Barbe V**, Médigue C, Bringel F. Complete genome sequence of the chloromethane-degrading Hyphomicrobium sp. strain MC1. J Bacteriol. 2011 Sep;193(18):5035-6. doi: 10.1128/JB.05627-11.

113. Petersen JM, Zielinski FU, Pape T, Seifert R, Moraru C, Amann R, Hourdez S, Girguis PR, Wankel SD, **Barbe V**, Pelletier E, Fink D, Borowski C, Bach W, Dubilier N. Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. Nature. 2011 Aug 10;476(7359):176-80. doi: 10.1038/nature10325.

114. Fevre C, Passet V, Deletoile A, **Barbe V**, Frangeul L, Almeida AS, Sansonetti P, Tournebize R, Brisse S. PCR-based identification of Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis, the agent of rhinoscleroma. PLoS Negl Trop Dis. 2011 May;5(5):e1052. doi: 10.1371/journal.pntd.0001052.

115. Ortet P, Barakat M, Lalaouna D, Fochesato S, **Barbe V**, Vacherie B, Santaella C, Heulin T, Achouak W. Complete genome sequence of a beneficial plant root- associated bacterium, Pseudomonas brassicacearum. J Bacteriol. 2011 Jun;193(12):3146. doi: 10.1128/JB.00411-11.

116. Mhedbi-Hajri N, Darrasse A, Pigné S, Durand K, Fouteau S, **Barbe V**, Manceau C, Lemaire C, Jacques MA. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. BMC Evol Biol. 2011 Mar 11;11:67. doi: 10.1186/1471-2148-11-67.

117. Thiaucourt F, Manso-Silvan L, Salah W, **Barbe V**, Vacherie B, Jacob D, Breton M, Dupuy V, Lomenech AM, Blanchard A, Sirand-Pugnet P. Mycoplasma mycoides, from "mycoides Small Colony" to "capri". A microevolutionary perspective. BMC Genomics. 2011 Feb 16;12:114. doi: 10.1186/1471-2164-12-114.

118. Remenant B, de Cambiaire JC, Cellier G, Jacobs JM, Mangenot S, **Barbe V**, Lajus A, Vallenet D, Medigue C, Fegan M, Allen C, Prior P. Ralstonia syzygii, the Blood Disease Bacterium and some Asian R. solanacearum strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. PLoS One. 2011;6(9):e24356. doi: 10.1371/journal.pone.0024356.

119. De Luca G, Barakat M, Ortet P, …, **Barbe V**, Weissenbach J, Mihalcescu I, Verméglio A, Achouak W, Heulin T. The cyst-dividing bacterium Ramlibacter tataouinensis TTB310 genome reveals a well-stocked toolbox for adaptation to a desert environment. PLoS One. 2011;6(9):e23784. doi: 10.1371/journal.pone.0023784.

120. Darracq A, Varré JS, Maréchal-Drouard L, Courseaux A, Castric V, Saumitou- Laprade P, Oztas S, Lenoble P, Vacherie B, **Barbe V**, Touzet P. Structural and content diversity of mitochondrial genome in beet: a comparative genomic analysis. Genome Biol Evol. 2011;3:723-36. doi: 10.1093/gbe/evr042.

121. Monnet C, Loux V, Gibrat JF, Spinnler E, **Barbe V**, Vacherie B, Gavory F, Gourbeyre E, Siguier P, Chandler M, Elleuch R, Irlinger F, Vallaeys T. The arthrobacter arilaitensis Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. PLoS One. 2010 Nov 24;5(11):e15489. doi: 10.1371/journal.pone.0015489.

122. Fonknechten N, Chaussonnerie S, Tricot S, Lajus A, Andreesen JR, Perchat N, Pelletier E, Gouyvenoux M, **Barbe V**, Salanoubat M, Le Paslier D, Weissenbach J, Cohen GN, Kreimeyer A. Clostridium sticklandii, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. BMC Genomics. 2010 Oct 11;11:555. doi: 10.1186/1471-2164-11-555.

123. Miquel S, Peyretaillade E, Claret L, de Vallée A, Dossat C, Vacherie B, Zineb el H, Segurens B, **Barbe V**, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF, Medigue C, Mojica FJ, Peyret P, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli strain LF82. PLoS One. 2010 Sep 17;5(9):e12714. doi: 10.1371/journal.pone.0012714.

124. Falentin H, Deutsch SM, Jan G, Loux V, Thierry A, Parayre S, Maillard MB, Dherbécourt J, Cousin FJ, Jardin J, Siguier P, Couloux A, **Barbe V**, Vacherie B, Wincker P, Gibrat JF, Gaillardin C, Lortal S. The complete genome of Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA1, a hardy

actinobacterium with food and probiotic applications. PLoS One. 2010 Jul 23;5(7):e11748. doi: 10.1371/journal.pone.0011748.

125. Remenant B, Coupat-Goutaland B, Guidot A, Cellier G, Wicker E, Allen C, Fegan M, Pruvost O, Elbaz M, Calteau A, Salvignol G, Mornico D, Mangenot S, **Barbe V**, Médigue C, Prior P. Genomes of three tomato pathogens within the Ralstonia solanacearum species complex reveal significant evolutionary divergence. BMC Genomics. 2010 Jun 15;11:379. doi: 10.1186/1471-2164-11-379.

126. Arsène-Ploetze F, Koechler S, Marchal M, …, **Barbe V**, …, Weissenbach J, Médigue C, Bertin PN. Structure, function, and evolution of the Thiomonas spp. genome. PLoS Genet. 2010 Feb 26;6(2):e1000859. doi: 10.1371/journal.pgen.1000859.

127. Peña A, Teeling H, Huerta-Cepas J, Santos F, Yarza P, Brito-Echeverría J, Lucio M, Schmitt-Kopplin P, Meseguer I, Schenowitz C, Dossat C, **Barbe V**, Dopazo J, Rosselló-Mora R, Schüler M, Glöckner FO, Amann R, Gabaldón T, Antón J. Fine- scale evolution: genomic, phenotypic and ecological differentiation in two coexisting Salinibacter ruber strains. ISME J. 2010 Jul;4(7):882-95. doi: 10.1038/ismej.2010.6.

128. Nouvel LX, Sirand-Pugnet P, Marenda MS, Sagné E, **Barbe V**, Mangenot S, Schenowitz C, Jacob D, Barré A, Claverol S, Blanchard A, Citti C. Comparative genomic and proteomic analyses of two Mycoplasma agalactiae strains: clues to the macro- and micro-events that are shaping mycoplasma diversity. BMC Genomics. 2010 Feb 2;11:86. doi: 10.1186/1471-2164-11-86.

129. Touzain F, Denamur E, Médigue C, **Barbe V**, El Karoui M, Petit MA. Small variable segments constitute a major type of diversity of bacterial genomes at the species level. Genome Biol. 2010;11(4):R45. doi: 10.1186/gb-2010-11-4-r45.

130. Pieretti I, Royer M, **Barbe V**, Carrere S, Koebnik R, Cociancich S, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques MA, Lauber E, Manceau C, Mangenot S, Poussier S, Segurens B, Szurek B, Verdier V, Arlat M, Rott P. The complete genome sequence of Xanthomonas albilineans provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. BMC Genomics. 2009 Dec 17;10:616. doi: 10.1186/1471-2164-10-616.

131. Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L, Charron A, Renaudin H, Barré A, Avenaud P, Jacob D, Couloux A, **Barbe V**, de Daruvar A, Blanchard A, Bébéar C. Life on arginine for Mycoplasma hominis: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. PLoS Genet. 2009 Oct;5(10):e1000677. doi: 10.1371/journal.pgen.1000677.

132. Jeong H, **Barbe V**, Lee CH, Vallenet D, Yu DS, Choi SH, Couloux A, Lee SW, Yoon SH, Cattolico L, Hur CG, Park HS, Ségurens B, Kim SC, Oh TK, Lenski RE, Studier FW, Daegelen P, Kim JF. Genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3). J Mol Biol. 2009 Dec 11;394(4):644-52. doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.052.

133. Böhne A, Schultheis C, Galiana-Arnoux D, Froschauer A, Zhou Q, Schmidt C, Selz Y, Ozouf-Costaz C, Dettai A, Segurens B, Couloux A, Bernard-Samain S, **Barbe V**, Chilmonczyk S, Brunet F, Darras A, Tomaszkiewicz M, Semon M, Schartl M, Volff JN. Molecular analysis of the sex

chromosomes of the platyfish Xiphophorus maculatus: Towards the identification of a new type of master sexual regulator in vertebrates. Integr Zool. 2009 Sep;4(3):277-84. doi: 10.1111/j.1749-4877.2009.00166.x.

134. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, **Barbe V**, Rottman M, Macheras E, Heym B, Herrmann JL, Daffé M, Brosch R, Risler JL, Gaillard JL. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. PLoS One. 2009 Jun 19;4(6):e5660. doi: 10.1371/journal.pone.0005660.

135. Génolevures Consortium, Souciet JL, Dujon B, Gaillardin C, …, **Barbe V**, …, Straub ML, Talla E. Comparative genomics of protoploid Saccharomycetaceae. Genome Res. 2009 Oct;19(10):1696-709. doi: 10.1101/gr.091546.109.

136. **Barbe V**, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Médigue C, Danchin A. From a consortium sequence to a unified sequence: the Bacillus subtilis 168 reference genome a decade later. Microbiology. 2009 Jun;155(Pt 6):1758-1775. doi: 10.1099/mic.0.027839-0.

137. Nouvel LX, Marenda M, Sirand-Pugnet P, Sagné E, Glew M, Mangenot S, **Barbe V**, Barré A, Claverol S, Citti C. Occurrence, plasticity, and evolution of the vpma gene family, a genetic system devoted to high-frequency surface variation in Mycoplasma agalactiae. J Bacteriol. 2009 Jul;191(13):4111-21. doi: 10.1128/JB.00251-09

138. Lescat M, Calteau A, Hoede C, **Barbe V**, Touchon M, Rocha E, Tenaillon O, Médigue C, Johnson JR, Denamur E. A module located at a chromosomal integration hot spot is responsible for the multidrug resistance of a reference strain from Escherichia coli clonal group A. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jun;53(6):2283-8. doi: 10.1128/AAC.00123-09.

139. Peigne C, Bidet P, Mahjoub-Messai F, Plainvert C, **Barbe V**, Médigue C, Frapy E, Nassif X, Denamur E, Bingen E, Bonacorsi S. The plasmid of Escherichia coli strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic E. coli plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. Infect Immun. 2009 Jun;77(6):2272-84. doi: 10.1128/IAI.01333-08.

140. de Groot A, Dulermo R, Ortet P, Blanchard L, Guérin P, Fernandez B, Vacherie B, Dossat C, Jolivet E, Siguier P, Chandler M, Barakat M, Dedieu A, **Barbe V**, Heulin T, Sommer S, Achouak W, Armengaud J. Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium Deinococcus deserti. PLoS Genet. 2009 Mar;5(3):e1000434. doi: 10.1371/journal.pgen.1000434.

141. Vuilleumier S, Chistoserdova L, Lee MC…, **Barbe V**, …, Weissenbach J, Médigue C, Lidstrom ME. Methylobacterium genome sequences: a reference blueprint to investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. PLoS One. 2009;4(5):e5584. doi: 10.1371/journal.pone.0005584.

142. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, **Barbe V**, …, Vallenet D, Médigue C, Rocha EP, Denamur E. Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths. PLoS Genet. 2009 Jan;5(1):e1000344. doi: 10.1371/journal.pgen.1000344.

143. Aury JM, Cruaud C, **Barbe V**, Rogier O, Mangenot S, Samson G, Poulain J, Anthouard V, Scarpelli C, Artiguenave F, Wincker P. High quality draft sequences for prokaryotic genomes using a mix of new sequencing technologies. BMC Genomics. 2008 Dec 16;9:603. doi: 10.1186/1471-2164-9-603.

144. Amadou C, Pascal G, Mangenot S, Glew M, Bontemps C, Capela D, Carrère S, Cruveiller S, Dossat C, Lajus A, Marchetti M, Poinsot V, Rouy Z, Servin B, Saad M, Schenowitz C, **Barbe V**, Batut J, Médigue C, Masson-Boivin C. Genome sequence of the beta-rhizobium Cupriavidus taiwanensis and comparative genomics of rhizobia. Genome Res. 2008 Sep;18(9):1472-83. doi: 10.1101/gr.076448.108.

145. Vallenet D, Nordmann P, **Barbe V**, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, Oztas S, Poulain J, Segurens B, Robert C, Abergel C, Claverie JM, Raoult D, Médigue C, Weissenbach J, Cruveiller S. Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles. PLoS One. 2008 Mar 19;3(3):e1805. doi: 10.1371/journal.pone.0001805.

146. Plainvert C, Bidet P, Peigne C, **Barbe V**, Médigue C, Denamur E, Bingen E, Bonacorsi S. A new O-antigen gene cluster has a key role in the virulence of the Escherichia coli meningitis clone O45:K1:H7. J Bacteriol. 2007 Dec;189(23):8528-36. doi: 10.1128/JB.01013-07.

147. Giraud E, Moulin L, Vallenet D, **Barbe V**, Cytryn E, Avarre JC, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck WL, Chang WS, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Verméglio A, Médigue C, Sadowsky M. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. Science. 2007 Jun 1;316(5829):1307-12. doi: 10.1126/science.1139548.

148. Sirand-Pugnet P, Lartigue C, Marenda M, Jacob D, Barré A, **Barbe V**, Schenowitz C, Mangenot S, Couloux A, Segurens B, de Daruvar A, Blanchard A, Citti C. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. PLoS Genet. 2007 May 18;3(5):e75. doi: 10.1371/journal.pgen.0030075.

149. Muller D, Médigue C, Koechler S, **Barbe V**, …, Weissenbach J, Lett MC, Danchin A, Bertin PN. A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. PLoS Genet. 2007 Apr 13;3(4):e53.doi: 10.1371/journal.pgen.0030053.

150. Choulet F, Aigle B, Gallois A, Mangenot S, Gerbaud C, Truong C, Francou FX, Fourrier C, Guérineau M, Decaris B, **Barbe V**, Pernodet JL, Leblond P. Evolution of the terminal regions of the Streptomyces linear chromosome. Mol Biol Evol. 2006 Dec;23(12):2361-9. doi: 10.1093/molbev/msl108.

151. Choulet F, Gallois A, Aigle B, Mangenot S, Gerbaud C, Truong C, Francou FX, Borges F, Fourrier C, Guérineau M, Decaris B, **Barbe V**, Pernodet JL, Leblond P. Intraspecific variability of the terminal inverted repeats of the linear chromosome of Streptomyces ambofaciens. J Bacteriol. 2006 Sep;188(18):6599-610. doi: 10.1128/JB.00734-06.

152. van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, **Barbe V**, Bryson K, Nicolas P, Robert C, Oztas S, Mangenot S, Couloux A, Loux V, Dervyn R, Bossy R, Bolotin A, Batto JM, Walunas T, Gibrat JF, Bessières P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Maguin E. The complete genome sequence of Lactobacillus bulgaricus reveals extensive and ongoing reductive evolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 13;103(24):9274-9. doi: 10.1073/pnas.0603024103.

153. Marenda M, **Barbe V**, Gourgues G, Mangenot S, Sagne E, Citti C. A new integrative conjugative element occurs in Mycoplasma agalactiae as chromosomal and free circular forms. J Bacteriol. 2006 Jun;188(11):4137-41. doi: 10.1128/JB.00114-06.

154. Vodovar N, Vallenet D, Cruveiller S, Rouy Z, **Barbe V**, Acosta C, Cattolico L, Jubin C, Lajus A, Segurens B, Vacherie B, Wincker P, Weissenbach J, Lemaitre B, Médigue C, Boccard F. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium Pseudomonas entomophila. Nat Biotechnol. 2006 Jun;24(6):673-9. doi: 10.1038/nbt1212.

155. Strous M, Pelletier E, Mangenot S, …, **Barbe V**, …, Jetten MS, Wagner M, Le Paslier D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. Nature. 2006 Apr 6;440(7085):790-4. doi: 10.1038/nature04647.

156. Fournier PE, Vallenet D, **Barbe V**, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. Comparative genomics of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. PLoS Genet. 2006 Jan;2(1):e7. doi: 10.1371/journal.pgen.0020007.

157. Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, **Barbe V**, Bocs S, Cruveiller S, Lajus A, Pascal G, Scarpelli C, Médigue C. MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. Nucleic Acids Res. 2006 Jan 10;34(1):53-65. doi: 10.1093/nar/gkj406.

158. Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, **Barbe V**, Peyretaillade E, Brottier P, Wincker P. Seroprevalence of Toxoplasma gondii Antibodies in Humans From Rural Western Amazon, Brazil. J. ParasitoL 2006;92(3):647-649

159. Médigue C, Krin E, Pascal G, **Barbe V**, …, Vallenet D, von Heijne G, Danchin A. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125. Genome Res. 2005 Oct;15(10):1325-35. doi: 10.1101/gr.4126905.

160. Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, …, **Barbe V**, …, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL. Genome evolution in yeasts. Nature. 2004 Jul 1;430(6995):35-44. doi: 10.1038/nature02579.

161. **Barbe V**, Vallenet D, Fonknechten N, Kreimeyer A, Oztas S, Labarre L, Cruveiller S, Robert C, Duprat S, Wincker P, Ornston LN, Weissenbach J, Marlière P, Cohen GN, Médigue C. Unique features revealed by the genome sequence of Acinetobacter sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. Nucleic Acids Res. 2004 Oct 28;32(19):5766-79. doi: 10.1093/nar/gkh910.

162. Dufresne A, Salanoubat M, Partensky F, Artiguenave F, Axmann IM, **Barbe V**, Duprat S, Galperin MY, Koonin EV, Le Gall F, Makarova KS, Ostrowski M, Oztas S, Robert C, Rogozin IB, Scanlan DJ, Tandeau de Marsac N, Weissenbach J, Wincker P, Wolf YI, Hess WR. Genome sequence of the cyanobacterium Prochlorococcus marinus SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 19;100(17):10020-5. doi: 10.1073/pnas.1733211100.

163. Cohen GN, **Barbe V**, Flament D, Galperin M, Heilig R, Lecompte O, Poch O, Prieur D, Quérellou J, Ripp R, Thierry JC, Van der Oost J, Weissenbach J, Zivanovic Y, Forterre P. An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus abyssi. Mol Microbiol. 2003 Mar;47(6):1495-512. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03381.x.

164. Heilig R, Eckenberg R, Petit JL, …, **Barbe V**, …, Quétier F, Waterston R, Hood L, Weissenbach J. The DNA sequence and analysis of human chromosome 14. Nature. 2003 Feb 6;421(6923):601-7. doi: 10.1038/nature01348.

165. Chureau C, Prissette M, Bourdet A, **Barbe V**, Cattolico L, Jones L, Eggen A, Avner P, Duret L. Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine. Genome Res. 2002 Jun;12(6):894-908. doi: 10.1101/gr.152902.

166. Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prensier G, **Barbe V**, Peyretaillade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivarès CP. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite Encephalitozoon cuniculi. Nature. 2001 Nov 22;414(6862):450-3. doi: 10.1038/35106579.

167. Ogata H, Audic S, Renesto-Audiffren P, Fournier PE, **Barbe V**, Samson D, Roux V, Cossart P, Weissenbach J, Claverie JM, Raoult D. Mechanisms of evolution in Rickettsia conorii and R. prowazekii. Science. 2001 Sep 14;293(5537):2093-8. doi: 10.1126/science.1061471.

168. Chambaud I, Heilig R, Ferris S, **Barbe V**, Samson D, Galisson F, Moszer I, Dybvig K, Wróblewski H, Viari A, Rocha EP, Blanchard A. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen Mycoplasma pulmonis. Nucleic Acids Res. 2001 May 15;29(10):2145-53. doi: 10.1093/nar/29.10.2145.

169. Peyret P, Katinka MD, Duprat S, Duffieux F, **Barbe V**, Barbazanges M, Weissenbach J, Saurin W, Vivarès CP. Sequence and analysis of chromosome I of the amitochondriate intracellular parasite Encephalitozoon cuniculi (Microspora). Genome Res. 2001 Feb;11(2):198-207. doi: 10.1101/gr.164301.

170. Ogata H, Audic S, **Barbe V**, Artiguenave F, Fournier PE, Raoult D, Claverie JM. Selfish DNA in protein-coding genes of Rickettsia. Science. 2000 Oct 13;290(5490):347-50. doi: 10.1126/science.290.5490.347.

171. Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Dürr A, Wincker P, Brottier P, Cattolico L, **Barbe V**, Burgunder JM, Prud'homme JF, Brice A, Fontaine B, Heilig B, Weissenbach J. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. Nat Genet. 1999 Nov;23(3):296-303. doi: 10.1038/15472.

172. Lecompte O, Ripp R, **Puzos-Barbe V**, Duprat S, Heilig R, Dietrich J, Thierry JC, Poch O. Genome evolution at the genus level: comparison of three complete genomes of hyperthermophilic archaea. Genome Res. 2001 Jun;11(6):981-93. doi: 10.1101/gr.gr1653r.

173. Dujon B, Alexandraki D, André B, Ansorge W, Baladron V, Ballesta JP, Banrevi A, Bolle PA, Bolotin-Fukuhara M, Bossier P, Bou G, Boyer J, Bultrago MJ, Cheret G, Colleaux L, Dalgnan-Fornler B, del Rey F, Dlon C, Domdey H, Düsterhoft A, Düsterhus S, Entlan KD, Erfle H, Esteban PF, Feldmann H, Fernandes L, Robo GM, Fritz C, Fukuhara H, Gabel C, Gaillon L, Carcia-Cantalejo JM, Garcia-Ramirez JJ, Gent NE, Ghazvini M, Goffeau A, Gonzaléz A, Grothues D, Guerreiro P, Hegemann J, Hewitt N, Hilger F, Hollenberg CP, Horaitis O, Indge KJ, Jacquier A, James CM, Jauniaux C, Jimenez A, Keuchel H, Kirchrath L, Kleine K, Kötter P, Legrain P, Liebl S, Louis EJ, Maia e Silva A, Marck C, Monnier AL, Möstl D, Müller S, Obermaier B, Oliver SG, Pallier C, Pascolo S, Pfeiffer F, Philippsen P, Planta RJ, Pohl FM, Pohl TM, Pöhlmann R, Portetelle D, Purnelle B, **Puzos V**, Ramezani Rad M, Rasmussen SW, Remacha M, Revuelta JL, Richard GF, Rieger M, Rodrigues-Pousada C, Rose M, Rupp T, Santos MA, Schwager C, Sensen C, Skala J, Soares H, Sor F, Stegemann J, Tettelin H, Thierry A, Tzermia M, Urrestarazu LA, van Dyck L, Van Vliet-Reedijk JC, Valens M, Vandenbo M, Vilela C, Vissers S, von Wettstein D, Voss H, Wiemann S, Xu G, Zimmermann J, Haasemann M, Becker I, Mewes HW. Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. Nature. 1994 Jun 2;369(6479):371-8. doi: 10.1038/369371a0.

174. Pallier C, Valens M, **Puzos V**, Fukuhara H, Chéret G, Sor F, Bolotin-Fukuhara M. DNA sequence analysis of a 17 kb fragment of yeast chromosome XI physically localizes the MRB1 gene and reveals eight new open reading frames, including a homologue of the KIN1/KIN2 and SNF1 protein kinases. Yeast. 1993 Oct;9(10):1149-55. doi: 10.1002/yea.320091016.

Annexe 2 : Communications orales et posters

Communications internationales

- **2018:**
  - Plant and Animal Genome XXVI Conference. “The Pisum Genus: Getting out of Pea Soup!“ Jonathan Kreplak, Mohammed-Amin Madoui, Karine Labadie, Grégoire Aubert, Petr Capal, Philipp E Bayer, Petr Novak, Anthony Klein, Krishna Kishore Gali, Cyril Fournier, Léo d'Agata, Ayite Kougbeadjo, Morgane Terezol, Bunyamin Taran, Caroline Belser, Françoise Jacquin, Marianne Chabert-Martinello, Marie-Christine Le Paslier, A Bendahmane, **Valerie Barbe**, Matthieu Falque, Pavel Neumann, Jacqueline Batley, Clarice J Coyne, Tom Warkentin, David Edwards, Judith Lichtenzveig, Jiri Macas, Jaroslav Dolezel, Patrick Wincker, Judith Burstin. San Diego, USA, 13-17 janvier

- **2017:**
  - 8. International Conference on Legume Genetics and Genomics (ICLGG). “The pea genome.” Jonathan Kreplak, Mohammed-Amin Madoui, Karine Labadie, Gregoire Aubert, Philippe Bayer, P Capal, Anthony Klein, Ayité Kougbeadjo, J Vrana, KK Gali, Carine Fournier, Léo d'Agata, B Taran, C Belser, Marie-Christine Le Paslier, Abdelhafid Bendahmane, Helene Berges, **V Barbe**, Rebecca Mcgee, Judith Lichtenzveig, Clarice J Coyne, Tom D Warkentin, J Batley, Jiří Macas, Dave Edwards, Jaroslav Dolezel, Patrick Wincker, Judith Burstin. Siófok, Lake Balaton, Hongrie, 18-22 septembre

  - Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE). “Joining the team: Co-obligate symbionts of aphids evolving from distantly related bacteria.” Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Anne Laure Clamens, Céline Orvain, Corinne Cruaud, **Valérie Barbe**, Emmanuelle Jousselin. Austin, USA, 2-6 Juillet

- **2016**:
  - 2. International Legume Society Conference-Legumes for a Sustainable World. “Towards the genome sequence of pea: a tribute to Mendel.” Mohammed-Amin Madoui, K Labadie, Jonathan Kreplak, Gregoire Aubert, Léo d'Agata, P Capal, Carine Fournier, Ayité Kougbeadjo, J Vrana, K Gali, B Taran, C Belser, Marie-Christine Le Paslier, Rebecca Mcgee, D Edwards, J Batley, Abdelhafid Bendahmane, Helene Berges, **Valérie Barbe**, Nadim Tayeh, Anthony Klein, Judith Lichtenzveig, JM Aury, CJ Coyne, T Warkentin, J Dolezel, P Wincker, Judith Burstin. Troia, Portugal, 11-14 octobre

  - 25. International Congress of Entomology (ICE 2016). “Mechanisms of transfer of virulence molecules in ichneumonid wasps.” Anne-Nathalie Volkoff, Apolline Pichon, Magali Eychenne, Marc Ravallec, Antoine Bézier, Matthieu Leobold, Véronique Jouan, Serge Urbach, **Valérie Barbe**, Jean-Michel Drezen, Fabrice Legeai, Don Stoltz. Orlando, USA, 25-30 Septembre

- Plant and Animal Genome XXIV Conference; IWGSC Standards and Protocoles Workshop." Sequencing and Analysis of Wheat Chromosome 1B." Frédéric Choulet, Hélène Rimbert, Ambre-Aurore Josselin, Benoît Darrier, Pierre Sourdille, Francois Balfourier, **Valérie Barbe**, Adriana Alberti, Karine Labadie, Sophie Mangenot, Arnaud Couloux, Patrick Wincker, Helene Berges, Michael Alaux, Thomas Letellier, Hadi Quesneville, Zeev Frenkel, Tzion Fahima, Abraham Korol, Etienne Paux. San Diego, USA, 9-13 janvier

- **2015:**
  - Plant and Animal Genome XXIII: standards and protocols. "Chromosome 1B: A Step Further in the Sequencing of the Hexaploid Wheat Genome". **Valérie Barbe**. San Diego, USA, 10-14 janvier

  - 3. Plant Genomics Congress. "A reference sequence of wheat chromosome 3B." Frédéric Choulet, Adriana Alberti, Sébastien Theil, Natasha Marie Glover, **Valérie Barbe**, Josquin Daron, Lise Pingault, Pierre Sourdille, Arnaud Couloux, Etienne Paux, Philippe Leroy, Sophie Mangenot, Nicolas Guilhot, Jacques Le Gouis, François Balfourier, Michael Alaux, Veronique Jamilloux, Julie Poulain, Céline Duran, Arnaud Bellec, Christine Gaspin, Jaroslav Dolezel, Jane Roger, Kent Vandepoele, Klaus Mayer, Helene Berges, Patrick Quesneville, P Wincker, Catherine Feuillet. Saint Louis, USA, 14-15 septembre

  - Arthropod Genomics Symposium. "Using genomic tools to unravel parasitic wasp genome evolution via acquisition of viral genomes." Anne-Nathalie Volkoff, Jean-Michel Drezen, Serge Urbach, Apolline Pichon, Véronique Jouan, Marc Ravallec, Annie Bezier, Jean-Marc Aury, Julie Guy, Francois Cousserans, **Valérie Barbe**, Fabrice Legeai, Denis Tagu, L Li. Kansas, USA, 17-19 juin

- **2014** :
  - Plant and Animal Genome XXII: standards and protocols. "Strategy developments for the Wheat Chromosome MTP Sequencing". Frédéric Choulet, Adriana Alberti, **Valérie Barbe**, Sébastien Theil, Pierre Sourdille, François Balfourier, Jean-Marc Aury, Helene Berges, Jaroslav Dolezel, Hadi Quesneville, Patrick Wincker, Catherine Feuillet. San Diego, USA, 10-15 janvier

  - Plant and Animal Genome XXII Conference: "Assembling a pseudomolecule for a wheat chromosome: the 3B experience." Frédéric Choulet, Adriana Alberti, **Valérie Barbe**, Sébastien Theil, Pierre Sourdille, François Balfourier, Jean-Marc Aury, Helene Berges, Jaroslav Dolezel, Hadi Quesneville, Patrick Wincker, Catherine Feuillet. San Diego, USA, 10-15 janvier

  - 10. European Congress of Entomology (ECE). "Recurrent domestication of viruses by parasitic wasps to face host immune defenses." Jean-Michel Drezen, Annie Bezier, Apolline Pichon, Véronique Jouan, Georges Periquet, Gabor Gyapay, **Valérie Barbe**, Elisabeth A Herniou, Elisabeth Huguet, Anne-Nathalie Volkoff. York, UK, 3-8 août

- **2013** :

- Plant and Animal Genome XXI: standards and protocols. “Assembly improvement techniques: applied to the 1Gb wheat chromosome 3B (3BSEQ project)”. **Valérie Barbe**, Frédéric Choulet, Sébastien Theil, Josquin Daron, Natasha Marie Glover, Nicolas Guilhot, Philippe Leroy, Lise Pingault, Etienne Paux, Pierre Sourdille, Adriana Alberti, Sophie Mangenot, Arnaud Couloux, Jean Marc Aury, Arnaud Bellec, Helene Berges, Jaroslav Dolezel, Michael Alaux, Hadi Quesneville, Patrick Wincker, Catherine Feuillet. San Diego, USA, 12-16 janvier

- IWGSC Wheat Genome Sequencing Strategy and Funding Workshop: “Wheat whole genome sequencing strategy propositions”. **Valérie Barbe**, Frédéric Choulet, Sébastien Theil, Josquin Daron, Natasha Marie Glover, Nicolas Guilhot, Philippe Leroy, Lise Pingault, Etienne Paux, Pierre Sourdille, Adriana Alberti, Sophie Mangenot, Arnaud Couloux, Jean Marc Aury, Arnaud Bellec, Helene Berges, Jaroslav Dolezel, Michael Alaux, Hadi Quesneville, Patrick Wincker, Catherine Feuillet.: San Diego, USA, 12-16 janvier

- IWGSC Wheat Genome Sequencing Strategy and Funding Workshop: “Sequencing and Assembling a Reference Sequence of the 1 Gb Wheat Chromosome 3B.” Frédéric Choulet, Sébastien Theil, Josquin Daron, Natasha Marie Glover, Nicolas Guilhot, Philippe Leroy, Lise Pingault, Etienne Paux, Pierre Sourdille, Adriana Alberti, **Valérie Barbe**, Sophie Mangenot, Arnaud Couloux, Jean Marc Aury, Arnaud Bellec, Helene Berges, Jaroslav Dolezel, Michael Alaux, Hadi Quesneville, Patrick Wincker, Catherine Feuillet. San Diego, USA, 12-16 janvier

- 59° Congresso Brasileiro de Genética: “Genome mining reveals a novel and promising NRPS gene cluster in Xanthomonas albilineans, Xanthomonas oryzae and Xanthomonas translucens.” Monique Royer, Ralf Koebnik, Melanie Marguerettaz, **Valérie Barbe**, Guillaume P Robin, Christelle Brin, Sebastien Carrere, Camila Gomez, Manuela Hügelland, Ginka H Völler, Julie Noell, Isabelle Pieretti, Saskia Rausch, Valerie Verdier, Stéphane Poussier, Philippe Rott, Roderich Süssmuth, Stephane Cociancich. Brazil, 12 avril

- **2012:**
  - TGAC/ESF-LESC workshop, Strategies for de novo assemblies of complex crop genomes A strategy to assemble a reference sequence of the 1 Gb wheat chromosome 3B. Frédéric Choulet, Sébastien Theil, Josquin Daron, Natasha Marie Glover, Nicolas Guilhot, Philippe Leroy, Lise Pingault, Etienne Paux, Pierre Sourdille, Arnaud Couloux, Sophie Mangenot, **Valérie Barbe**, Jean-Marc Aury, Adriana Alberti, Michael Alaux, Hadi Quesneville, Patrick Wincker, Catherine Feuillet. Norwich, GBR, octobre

- **2011 :**
  - 16 International Conference on Bacilli. “Genomic diversity of 24 Propionibacterium freudenreichii 1 strains.” Hélène Falentin, Valentin Loux, **Valérie Barbe**, Amal Plaudet Hammani, Stéphanie-Marie Deutsch, Sandrine Parayre-Breton, Marie-Bernadette Maillard, Gwénaël Jan, Anne Thierry, Helene Chiapello, Jean-Francois Gibrat, Yves Le Loir. 6 Conference on Functional Genomics of Gram-positive Microorganisms. Göttingen, Allemagne.

- Epigenetics and development programming conference: “Long non-coding RNAs and chromatin modifications control long-range regulation of FOXL2, the key gene for ovarian differentiation in goat.” Maëlle Pannetier, Ayhan Kocer, Lauriane Renault, Benoit Vacherie, Laurence Cattolico, **Valérie Barbe**, Dominique Thepot, Eric Pailhoux. USA

- ProkaGENOMICS. “The complete genome sequence of Xanthomonas albilineans provides insights into pathogenicity of this sugarcane pathogen and allows further assessments of the large diversity.” Isabelle Pieretti, Stéphane Cociancich, **Valérie Barbe**, Sébastien Carrere, Ralf Koebnik, Patrice Champoiseau, Arnaud Couloux, Armelle Darrasse, Jérôme Gouzy, Marie Agnès Jacques, Emmanuelle Lauber, Charles Manceau, Sophie Mangenot, Mélanie Marguerettaz, Stéphane Poussier, Béatrice Segurens, Boris Szurek, Valérie Verdier, Mathieu Arlat, Dean W Gabriel, Philippe Rott, Monique Royer. Göttigen, Allemagne, 21 septembre

- **2010 :**
  - EMBL Advanced Training Centre-The Non-Coding Genome : « New long non-coding RNAs are associated with long-range regulation of FOXL2 in goat. » Maelle Pannetier, Ayhan Kocer, Lauriane Renault, Benoît Vacherie, L Cattolico, **Valérie Barbe**, Dominique Thépot, Eric Pailhoux. Heidelberg, Allemagne 13-16 Octobre

- **2009**:
  - Sequencing, Finishing and Analysis in the Future Meeting. “Relative positioning of scaffolds : a challenge with new sequencing technologies”. Santa Fe, USA, 27-29 mai

  - Workshop of StatSeq COST Action TD0801: “Towards sequencing the 1 Gb wheat chromosome 3B.” Frédéric Choulet, Etienne Paux, Philippe Leroy, Pierre Sourdille, Stéphane Schlub, Dominique Brunel, **Valérie Barbe**, Patrick Wincker, Catherine Feuillet. Barcelone, Espagne, octobre
- **2008 :**
  - 17. IOM Congress. “Comparing the genome and proteome of two Mycoplasma agalactiae strains: clues to the macro-and micro-events that are shaping mycoplasma diversity.” Christine Citti, Xavier Nouvel, Marc Marenda, **Valérie Barbe**, Sophie Mangenot, Stéphane Claverol, Pascal Sirand-Pugnet, Alain Blanchard. Tianjin, Chine, juillet

  - 108. General meeting of the American Society for Microbiology: “The genome sequence of Mycoplasma hominis and comparison with the minimal bacterial genomes of the human pathogens, M. genitalium and Ureaplasma parvum.” Sabine Pereyre, Pascal Sirand-Pugnet, A Barre, A Charron, P Avenaud, Laure Beven, D Jacob, A Couloux, **V Barbe**, A de Daruvar, Alain Blanchard, CM Bebear. Boston, USA, 1-5 juin

  - 15th International Nitrogen Fixation Congress; 12th International Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation: “The mosaic genomes of two phtosynthetic Bradyrhizobium strains do not contain canonical nodulation genes.” Eric Giraud, Lionel Moulin, Jean-Christophe Avarre, Marianne Jaubert, **Valérie Barbe**, Gilles Béna, F Cartiaux, Philippe De Lajudie, Bernard Dreyfus, D Elmerich, Joël Fardoux, Laure Hannibal, Mila Kojadinovic, Aurélie Lajus, Sophie Mangenot, Claudine Medigue, David

Pignol, Yves Prin, Zoe Rouy, Gary Stacey, David Vallenet, André Vermeglio, Laurie Vuillet, Michael Sadowsky. Cap Town, Afrique du Sud, 21-26 janvier

- **2006 :**
  - 16. International congress of the International Organization for Mycoplasmology. "The complete genome sequence of the human urogenital mycoplasma, Mycoplasma hominis." Sabine Pereyre, Philippe Avenaud, Alain Charron, Pascal Sirand-Pugnet, Daniel Jacob, Arnaud Couloux, **Valérie Barbe**, Antoine de Daruvar, Alain Blanchard, Cécile M Bébéar. Cambridge, UK, juillet

  - 7th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. "Acinetobacter spp.: Three genomes for three lifestyles". **Valérie Barbe.** Barcelone, Espagne, 8-10 novembre

- **2003:**
  - Streptomyces dissemination meeting. "Evidence for a High Heterogeneity Between the Terminal Regions of the Chromosomes of Two Phylogenetically Close Species, Streptomyces ambofaciens and Streptomyces coelicolor by Genome Comparison." Frédéric Choulet, Bertrand Aigle, FX Francou, Alexandre Gallois, Céline Fourrier, Sophie Mangenot, C Gerbaud, **Valérie Barbe**, Bernard Decaris, M Guérineau, JL Pernodet, Pierre Leblond.Charlotte, USA, 9-13 août

- **2000:**
  - Annual meeting of the british plant pathology. "The complete genome sequence of the plant pathogenic bacteria Ralstonia solanacearum." Christiane Boucher, Francois Artiguenave, Matthieu Arlat**, Valérie Barbe**, A Billau, Philippe Brottier, Laurence Cattolico, Nathalie Choisne, Christine Gaspin, Stéphane Genin, Jerome Gouzy, Daniel Kahn, M Levy, A Moisan, C Robert, William Saurin, M Seguin, Thomas Schiex, P Thebault, Patrick Wincker, Jean Weissenbach, Marcel Salanoubat.

Communications nationales

- **2018**:
  - Rencontres ALPHY/GTGC. "Ongoing Symbiont Replacement in the Aphid Cinara strobi." Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Anne Laure Clamens, Céline Orvain, Corinne Cruaud, **Valérie Barbe**, Emmanuelle Jousselin. Montpellier, France, 7-8 février

- **2017:**
  - International Conference on Holobionts. "The newcomers: distantly related bacteria have settled as co-obligate symbionts in aphids." Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Céline Orvain, Corinne Cruaud, **Valérie Barbe**, Emmanuelle Jousselin. Paris, France, 19-21 avril

- **2016 :**

- Genomics and Forest Tree Genetics Conference. « Oak genome sequencing and evolution. » Jerome Salse, Jean Marc Aury, Florent Murat, Sébastien Faye, Karine Labadie, Carole Dossat, Leo D'agata, Corinne da Silva, **Valérie Barbe**, Patrick Wincker, Christophe Klopp, Patricia Faivre-Rampant, Helene Berges, Joelle Amselem, Hadi Quesneville, Nicolas Francillonne, Catherine Bodénès, Grégoire Le Provost, Céline Lalanne, Franck Salin, François Ehrenmann, Thibault Leroy, Isabelle Lesur, Antoine Kremer, Christophe Plomion. Arcachon, France, 30 mai-3 juin

- Réunion du réseau ADALEP. « Recurrent domestication of viral genomes leads to different virulence strategies in ichneumonid wasps." Jean Marc Aury, **Valérie Barbe**, Annie Bezier, Jean-Michel Drezen, Véronique Jouan, Fabrice Legeai, L Li, Apolline Pichon, Marc Ravallec, Serge Urbach, Anne-Nathalie Volkoff. France

- **2014 :**
  - Réunion annuelle du Réseau Ecologie des Interactions Durables (REID). « Origine évolutive des "Virus-like particles" de Venturia canescens. » Apolline Pichon, Serge Urbach, Jean Marc Aury, Annie Bezier, Véronique Jouan, Marc Ravallec, François Wurmser, Julie Guy, **Valérie Barbe**, Francois Cousserans, Jérémy Gauthier, Edith Demettre, Vonnick Sibut, Jean-Michel Drezen, Anne-Nathalie Volkoff. Montpellier, France, 10-13 Février

  - CNRS Jacques Monod Conference" Infectious diseases as drivers of evolution: the challenges ahead". "Acquisition of viruses as a driver in endoparasitic ichneumonid wasp evolution." Apolline Pichon, Serge Urbach, Annie Bezier, Jean Marc Aury, Véronique Jouan, Marc Ravallec, Julie Guy, Francois Cousserans, Marie Frayssinet, Dominique Colinet, **Valérie Barbe**, Jean-Michel Drezen, Anne-Nathalie Volkoff. Roscoff, France, 2-6 avril

- **2013** :
  - Colloque EPGV 2013: Détection, Gestion et Analyse du Polymorphisme des Génome Végétaux. « Optical Mapping to improve genome organization ». **Valérie Barbe**. Lusignan, France, 8-10 avril.

- 2012:
  - 4th Xanthomonas Genomics Conference: " Genome sequencing of Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli CFBP4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads." Armelle Darrasse, Sébastien Carrere, **Valérie Barbe**, Tristan Bourreau, Adriana Bernal, Sophie Bonneau, Chrystelle Brin, Stéphane Cociancich, Karine Durand, Stéphanie Fouteau, Lionel Gagnevin, Jerome Gouzy, Fabien Guérin, Endrick Guy, Arnaud Indiana, Ralf Koebnik, Emmanuelle Lauber, Alejandra Munoz, Laurent D Noel, Isabelle Pieretti, Stéphane Poussier, Olivier Pruvost, Isabelle Robene-Soustrade, Philippe Rott, Monique Royer, Boris Szurek, Marie-Anne Van Sluys, Valérie Verdier, Christian Vernière, Mathieu Arlat. Anger, France, 9 juillet

- **2011**:
  - Magnetotactic bacteria Workshop. "Genome sequencing and assembly of MO-1 and QH-2". **Valérie Barbe**. Marseille, France, 12 octobre

- Model Legume Congress 2011. “Development of genomic resources for Medicago truncatula and related legume crops.” Frederic Debellé, Marion Verdenaud, Anne-Marie Dudez, Nicolas Samson, Olivier Saurat, Chrystel Gibelin, Philippe Bardou, Céline Noirot, Emmanuel Courcelle, Erika Sallet, Sebastien Carrere, Pascal Gamas, Jerome Gouzy, Thomas Schiex, Bernadette Julier, Ghislaine Magdelenat, **Valérie Barbe**, Sylvie Samain, Nathalie Choisne, Béatrice Ségurens, Stéphanie Fouteau, Arnaud Couloux, Agnès Viollet, Anne Berger, Claude Carpelli, Patrick Wincker, Jean Weissenbach, Francis Quétier. Castanet Tolosan, France, Mai

- **2010:**
  - Rencontres plantes-bactéries. “Séquençage de trois nouvelles souches du complexe d'espèces Ralstonia solanacearum: pangénome et génomique comparative.” Benoit Remenant, Bénédicte Coupat-Goutaland, Gilles Cellier, Alice Guidot, Emmanuel Wicker, Sophie Mangenot, **Valérie Barbe**, Claudine Medigue, Philippe Prior. Aussois, France, 3-7 février
- **2009 :**
  - 7ème Colloque National de la Société Française de Phytopathologie. « La séquence complète du génome de Xanthomonas albilineans apporte un éclairage nouveau sur l'évolution des Xanthomonadaceae dont l'habitat est limité au xylème ». Isabelle Pieretti, Monique Royer, **Valérie Barbe**, Sébastien Carrère, Ralf Koebnik, Stéphane Cociancich, Arnaud Couloux, Armelle Darrasse, Jerome Gouzy, Marie Agnes Jacques, Emmanuelle Lauber, Charles Manceau, Sophie Mangenot, Stéphane Poussier, Béatrice Segurens, Boris Szurek, Valérie Verdier, Mathieu Arlat, Philippe Rott. Lyon, France, 8-11 juin

  - 19. International Triticeae Mapping Initiative-3rd COST Tritigen: “Sequencing, annotation and characterization of 17 Mb of chromosome 3B contigs provide novel insights into the wheat genome organization and evolution.” Frédéric Choulet, Etienne Paux, Jerome Salse, Philippe Leroy, Ghislaine Magdelenat, Sylvie Bernard-Samain, **Valérie Barbe**, Catherine Feuillet. Clermont-Frerrand, France

- **2008 :**
  - Genomes 2008 : « Small but dynamic genomes: evidences for massive horizontal gene transfer between ruminant pathogenic mycoplasmas. » Pascal Sirand-Pugnet, Marc Marenda, Daniel Jacob, Aurélien Barré, **Valérie Barbe**, Stéphane Claverol, Antoine de Daruvar, Alain Blanchard, Christine Citti.Paris, France, 8-11 avril

  - 8èmes Rencontres plantes-bactéries. « La séquence du génome de Xanthomonas albilineans dévoile des particularités surprenantes chez cette bactérie pathogène de la canne à sucre. » Isabelle Pieretti, Monique Royer, **Valérie Barbe**, Sébastien Carrere, Ralf Koebnik, Stéphane Cociancich, Arnaud Couloux, Armelle Darrasse, Jerome Gouzy, Marie Agnès Jacques, Emmanuelle Lauber, Charles Manceau, Sophie Mangenot, Stéphane Poussier, Béatrice Ségurens, Boris Szurek, Véronique Verdier, Mathieu Arlat, Philippe Rott. Aussois, France, 8-14 janvier

- **2006 :**

- 7èmes Rencontres plantes-bactéries. « Abscence de gènes nod chez certaines souches de Bradyrhizobium photosynthétiques révélée par l'analyse de la séquence de leurs génomes. » Lionel Moulin, Jean-Christophe Avarre, Marianne Jaubert, **Valérie Barbe**, Gilles Béna, F Cartiaux, P Delajudie, Bernard Dreyfus, D Elmerich, Joël Fardoux, L Hannibal, Mila Kojadinovic, Aurélie Lajus, Sophie Mangenot, Claudine Medigue, David Pignol, Yves Prin, Zoe Rouy, Gary Stacey, Michael Sadowsky, D Vallenet, André Vermeglio, Laurie Vuillet, E Giraud. Aussois, France, 20-24 mars

Posters

- **2020 :**
  - Plant and Animal Genome XXVIII Conference. "Long DNA technologies evaluation for plant structural variations detection: Nanopore ONT sequencing vs Bionano Genomics optical mapping." Aurélie Canaguier, Erwan Denis, Romane Guilbaud, Ghislaine Magdelenat, Caroline Belser, Benjamin Istace, Cruaud Corinne, Arnaud Lemainque, Patrick Wincker, Marie-Christine Le Paslier, Patricia Faivre-Rampant, **Valérie Barbe**. San Diego, USA, 11-15 janvier

- **2019** :
  - Premières Rencontres du GDR Polymères et Océans. « Dégradation des plastiques par les bactéries marines ». Jinguang Cheng, Justine Jacquin, Caroline Pandin, Charlène Odobel, Philippe Catala, David Pecqueur, Christophe Salmeron, Mireille Pujo-Pay, Pascal Conan, Boris Eyheraguibel, Anne-Marie Delort, **Valérie Barbe**, J Hoypierres, G Deligey, Stéphane Bruzaud, Pascale Fabre, Matthieu George, Jean-François Ghiglione, Anne-Leila Meistertzheim. Créteil, France, 24-26 juin

- **2018** :
  - 2. Joint Congress on Evolutionary Biology. "Coming and ceasing to be: Evolution of recent mutualistic associations in aphid endosymbionts." Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Anne Laure Clamens, Céline Orvain, Corinne Cruaud, **Valérie Barbe**, Emmanuelle Jousselin. Montpellier, France, 18-22 août

  - 50. anniversary of the neutral theory of molecular evolution; Annual Meeting of the SMBE."The coming and going of mutualistic symbionts: The ins and outs of co-obligate endosymbiont replacement in Cinara aphids." Alejandro Manzano-Marin, Armelle Coeur d'Acier, Anne Laure Clamens, Céline Orvain, Corinne Cruaud, **Valérie Barbe**, Emmanuelle Jousselin. Yokohama, Japon, 8-12 juillet

  - Plant and Animal Genome XXVI Conference. "Optical Mapping with the Saphyr System on Plant Genomes." Erwan Denis, Caroline Belser, Wahiba Berrabah, Ghislaine Magdelenat,

Corinne Cruaud, Arnaud Lemainque, Jean Marc Aury, **Valerie Barbe. San Diego, USA, 13-17 janvier**

- Plant and Animal Genome XXVI Conference. "Optimized Methods for High Molecular Weight Genomic DNA Isolation." Erwan Denis, Sophie Sanchez, Ghislaine Magdelenat, Corinne Cruaud, Arnaud Lemainque, Jean-Marc Aury, **Valerie Barbe. San Diego, USA, 13-17 janvier**

- **2017:**
  - JOBIM. "Ultra High throughput, single molecule mapping of replicating DNA." Nikita Menezes Braganca, Francesco de carli, Wahiba Berrabah, **Valérie Barbe**, Auguste Genovesio, Olivier Hyrien. Lille, 3-6 juillet

- **2015:**
  - 9. International Wheat Conference. "Impact of meiotic recombination on gene admixture for wheat improvement." Benoît Darrier, Frédéric Choulet, Natasha Marie Glover, Adriana Alberti, Sébastien Theil, **Valérie Barbe**, Josquin Daron, Lise Pingault, Arnaud Couloux, Etienne Paux, Philippe Leroy, Sophie Mangenot, Nicolas Guilhot, Jaroslav Dolezel, Jane Rogers, Kellye Eversole, Patrick Wincker, Catherine Feuillet, Pierre Sourdille. Sydney, Australie, 20-25 septembre

- **2013:**
  - Plant and Animal Genome XXIII Conference. "The three infectious Banana streak virus species present in the banana genome of Pisang Klutuk Wulung (PKW) are allelic." Matthieu Chabannes, Franc-Christophe Baurens, Pierre-Olivier Duroy, Stéphanie Bocs, Marie-Stéphanie Vernerey, Marguerite Rodier-Goud, **Valérie Barbe**, Philippe Gayral, Marie-Line Iskra Caruana. San Diego, USA, 10-14 janvier

- **2012:**
  - 16. Annual Advances in Genome Biology and Technology (AGBT). "Towards a reference sequence of the 1 Gb wheat chromosome 3B." Frédéric Choulet, Sébastien Theil, Adriana Alberti, **Valérie Barbe**, Sophie Mangenot, Arnaud Couloux, Nicolas Guilhot, Philippe Leroy, Josquin Daron, Michael Alaux, Jaroslav Dolezel, Arnaud Bellec, Helene Berges, Pierre Sourdille, Etienne Paux, Hadi Quesneville, Patrick Wincker, Catherine Feuillet. Orlando, USA, 12-15 février

- **2011:**
  - ProkaGENOMICS. "The complete genome of Xanthomonas albilineans provides insights into pathogenicity of this sugarcane pathogen and allows further assessments of the large diversity within this species." Isabelle Pieretti, Stéphane Cociancich, **Valérie Barbe**, Sébastien Carrere, Ralf Koebnik, Patrice Champoiseau, Arnaud Couloux, Armelle Darrasse, Jérôme Gouzy, Marie-Agnès Jacques, Emmanuelle Lauber, Charles Manceau, Sophie Mangenot, Mélanie Marguerettaz, Stéphane Poussier, Béatrice Segurens, Boris Szurek, Valérie Verdier, Matthieu Arlat, Dean W Gabriel, Philippe Rott, Monique Royer. Göttigen, Allemagne, 18-21 septembre

- **2010:**

- 3. International Symposium on Propionibacteria and Bifidobacteria: Dairy and Probiotic. “The complete genome of Propionibacterium freudenreichii CIRM 1 a hardy actinobacteria with food and probiotic applications.” Hélène Falentin, Stéphanie-Marie Deutsch, Sandrine Parayre-Breton, Julien Dherbecourt, Gwénaël Jan, Anne Thierry, Marie-Bernadette Maillard, Fabien Cousin, Valentin Loux, Julien Jardin, Patricia Siguier, Arnaud Couloux, **Valérie Barbe**, Patrick Wincker, Sylvie Lortal. Oviedo, Espagne, 1-4 juin

- **2008** :
  - 3rd Annual Finishing in the Future Meeting. « Optimization of finishing procedures at Genoscope in the frame of the New Sequencing Technologies ». **Barbe V.**, Mangenot S. , Anthouard V. , Aury J.M. ,Couloux A. , Dossat C. , Jubin C. , Vacherie B. 1, Vallenet D. , Scarpelli C. , Wincker P. and Weissenbach J. Santa Fe, USA, 28-30 mai

- **2006:**
  - 4. International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. “Complete sequencing of this pis locus in goat (500 KB) leads to the discovery of new pis-regulated transcripts expressed in ovaries.” Ayhan Kocer, Benoit Vacherie, Dominique Thépot, Laurence Cattolico, Maelle Pannetier, **Valérie Barbe**, Lauriane Renault, Corinne Cotinot, Eric Pailhoux. Kona, Hawaii, 24-28 avril

  - 16th IOM Congress. “Mycoplasma agalactiae genome: evidence for massive horizontal gene transfer between pathogenic, ruminant mycoplasmas.” Pascal Sirand-Pugnet, Marc Marenda, C Lartigue, Daniel Jacob, **Valérie Barbe**, Sophie Mangenot, Aurélien Barre, Alain Blanchard, Christine Citti. Cambridge, UK

- **2004** :
  - 6th International Symposium on the Biology of Acinetobacter. « Sequencing and analysis of two Acinetobacter baumannii genomes ». David Vallenet, **Valérie Barbe**, Catherine Robert, Béatrice Ségurens, Patrick Wincker, Georges Cohen, Laurent Labarre, Claudine Médigue, Didier Raoult, Jean-Michel Claverie, Michel Drancourt and Jean Weissenbach. Dublin, Ireland, 15-17 septembre

Annexe 3 : Dossier de presse

- **06 juillet 2021** : Les Echos : Contre les microplastiques, des pistes prometteuses qui tardent à se concrétiser : https://www.lesechos.fr/thema/articles/contre-les-microplastiques-des-pistes-prometteuses-qui-tardent-a-se-concretiser-1329838

- **02 octobre 2020** : Conférence CEA : https://www.youtube.com/watch?v=5f4jhq8bfEY&t=66s

- **20 avril 2020** : Ca m'intéresse : https://www.caminteresse.fr/environnement/plastique-la-mission-tara-au-chevet-des-fleuves-11136543/

- **1er mars 2020** : RFI : http://www.rfi.fr/fr/podcasts/20200301-tara-go%C3%A9lette-sentinelle-oc%C3%A9ans

- **13 janvier 2020** : Le Monde : Vidéo : PlanB https://www.lemonde.fr/planete/article/2020/01/13/plan-b-nos-fleuves-sont-aussi-pollues-au-plastique_6025671_3244.html ou https://www.facebook.com/lemonde.fr/videos/456330291917223/

- **7 décembre** : France 2 : 13h15 : https://www.francetvinfo.fr/replay-magazine/france-2/13h15/13h15-du-samedi-7-decembre-2019_3712411.html

- **27 Novembre** : Le Figaro : https://www.lefigaro.fr/sciences/des-microplastiques-retrouves-dans-les-fleuves-europeens-20191127

- **26 novembre** : BRUT : https://m.facebook.com/watch/?v=1558372904305630&_rdr
- **23 novembre** :Le Télégramme : https://www.letelegramme.fr/morbihan/lorient/tara-est-rentree-a-la-maison-23-11-2019-12440110.php

- **21 novembre** : France Bleu : https://www.francebleu.fr/infos/environnement/t-1574259201

- **14 novembre** : Curieux : https://www.curieux.live/2019/11/08/la-goelette-tara-traque-les-microplastiques-dans-la-garonne/

- **12 novembre** : France 3 Aquitaine La Rochelle : https://france3-regions.francetvinfo.fr/nouvelle-aquitaine/charente-maritime/la-rochelle/rochelle-voilier-scientifique-tara-mission-etudier-microplastiques-charries-fleuves-1748471.html

- **7 novembre** : Bordeaux Tendance : https://www.bordeauxtendances.fr/2019/11/07/la-fondation-tara-ocean-jette-lancre-en-nouvelle-aquitaine/

- **7 novembre** : France 3 Nouvelle Aquitaine Bordeaux : https://france3-regions.francetvinfo.fr/nouvelle-aquitaine/gironde/bordeaux/voilier-expedition-scientifique-tara-escale-bordeaux-1746767.html et https://youtu.be/92p9uFrrI1Q

- **7 novembre** : France 3 Aquitaine : Journal de 12/13h : https://france3-regions.francetvinfo.fr/nouvelle-aquitaine/emissions/jt-1213-aquitaine (entre 13:08 à 13:50)

- **19 octobre 2019** : Arte Info: https://www.arte.tv/fr/videos/093196-000-A/tara-piste-le-plastique-dans-les-fleuves/

- **12 octobre 2019** : Arte Junior : https://www.arte.tv/fr/videos/092906-000-A/un-voilier-pour-mesurer-la-pollution-plastique/

- **27 septembre** : EMBL : Point presse concernant le partenariat de La Fondation Tara Océan et de la Compagnie Nationale du Rhône - CNR https://www.embl.es/aboutus/communication_outreach/media_relations/2019/190916-Tara-EMBL-Grenoble/

- **19 septembre 2019** : La provence : https://www.laprovence.com/article/papier/5680442/tara-traque-les-microplastiques.html

- **18 septembre** : Journée à l'étang de Berre : Mon nom n'y apparaît pas mais j'apparais sur certaines photos. Seule scientifique à bord pour entamer une discussion entre autre avec les membres du GIPREB et bureau des guides du GR2013. Normalement c'était une journée sans médias. https://etangdeberre.org/actualite/la-goelette-tara-enquete-sur-letang-de-berre/ https://www.maritima.info/actualites/environnement/etang-de-berre/11197/etang-de-berre-la-traque-des-microplastiques-avec-tara.html

- **4 septembre 20**19 : franceinfo: https://www.francetvinfo.fr/replay-radio/le-billet-vert/le-billet-vert-tara-ocean-bien-plus-qu-une-expedition-scientifique_3592661.html

- **5 août 2019** : Le Figaro : https://www.lefigaro.fr/sciences/l-expedition-tara-a-la-conquete-du-microplastique-des-fleuves-20190805

- **31 juillet 2019** : RTBF : JT de 19H30 : http://www.vivreici.be/videos/detail_microplastiques-un-poison-dans-nos-fleuves?videoId=828975 ou https://www.rtbf.be/auvio/detail_microplastiques-un-poison-dans-nos-fleuves?id=2526745

- **31 juillet 2019** : RTBF.be https://www.rtbf.be/info/societe/detail_micro-plastiques-en-mer-une-pollution-venue-des-fleuves?id=10282848

- **25 juillet 2019** : JT 20h sur TF1

- **24 juillet 2019** : Le TELEGRAMME : https://www.letelegramme.fr/finistere/brest/oceans-tara-et-oceanopolis-main-dans-la-main-24-07-2019-12346575.php

- **19 Juin 2019 :** Le journal de mickey

- **19 Juin 2019**: MOPO : Hamburger Morgenpost: https://www.mopo.de/hamburg/wasserverschmutzung-in-hamburg-so-viel-plastik-steckt-in-der-elbe--32722560
  Repris entre autre par :
  https://www.focus.de/regional/hamburg/hamburg-wasserverschmutzung-in-hamburg-so-viel-plastik-steckt-in-der-elbe_id_10840597.html
  https://www.facebook.com/Rothenburgsort/posts/httpswwwmopodehamburgwasserverschmutzung-in-hamburg-so-viel-plastik-steckt-in-de/2531664743540061/

- **19 Juin 2019**: AFP : « Searching for the source of microplastics in European rivers"
  Repris entre autre par :
  - News Yahoo: https://news.yahoo.com/searching-source-microplastics-european-rivers-032716958.html?guccounter=1&guce_referrer=aHR0cHM6Ly93d3cuZ29vZ2xlLmNvbS8&guce_referrer_sig=AQAAAMuyA51EUI_bDbMe6wEWLYHGlSwks49OSTySB8y8HX-pyTGmBIpN98_sUqbFxiScTjliXIBMW_tHgzdWVJa-0DAN8SW40y2n6an8CbKngqSmOA_24gul05lGHN8G_m8D0JPK-uia5QYTzZtiDurtG7udwejY7eJNgtqpBQkeZUh7
  - France 24 : https://www.france24.com/en/20190619-searching-source-microplastics-european-rivers
  - RFI : http://www.rfi.fr/en/contenu/20190619-searching-source-microplastics-european-rivers
  - PhysOrg: https://phys.org/news/2019-06-source-microplastics-european-rivers.html

- **16 Juin 2019** : AFP : « Diez ríos de Europa, escenario de una pesquisa sobre microplásticos »
  Repris entre autre par :
  - RFI : http://www.rfi.fr/es/contenu/20190616-diez-rios-de-europa-escenario-de-una-pesquisa-sobre-microplasticos
  - SERTV : https://sertv.gob.pa/crisolfm/diez-rios-de-europa-escenario-de-pesquisa-sobre-microplasticos/
  - http://bloglemu.blogspot.com/2019/06/diez-rios-de-europa-escenario-de-una.html

- **02 février 2019 :** Les Savanturiers : « Coraux : attention monde fragile ». (https://www.cea.fr/go/savanturiers; https://www.youtube.com/watch?v=CFPSjMAoLtQ)

Annexe 4 :

Canaguier *et al. BMC Genomics* _####################_
https://doi.org/10.1186/s12864-022-08499-4

BMC Genomics

RESEARCH Open Access

Oxford Nanopore and Bionano genomics technologies evaluation for plant structural variation detection

Aurélie Canaguier[1], Romane Guilbaud[1], Erwan Denis[2], Ghislaine Magdelenat[2], Caroline Belser[3], Benjamin Istace[3], Corinne Cruaud[2], Patrick Wincker[3], Marie-Christine Le Paslier[1], Patricia Faivre-Rampant[1*] and Valérie Barbe[3]

Abstract

Background: Structural Variations (SVs) are genomic rearrangements derived from duplication, deletion, insertion, inversion, and translocation events. In the past, SVs detection was limited to cytological approaches, then to Next-Generation Sequencing (NGS) short reads and partitioned assemblies. Nowadays, technologies such as DNA long read sequencing and optical mapping have revolutionized the understanding of SVs in genomes, due to the enhancement of the power of SVs detection.

This study aims to investigate performance of two techniques, 1) long-read sequencing obtained with the MinION device (Oxford Nanopore Technologies) and 2) optical mapping obtained with Saphyr device (Bionano Genomics) to detect and characterize SVs in the genomes of the two ecotypes of *Arabidopsis thaliana*, Columbia-0 (Col-0) and Landsberg *erecta* 1 (*Ler*-1).

Results: We described the SVs detected from the alignment of the best ONT assembly and DLE-1 optical maps of *A. thaliana Ler*-1 against the public reference genome Col-0 TAIR10.1. After filtering (SV > 1 kb), 1184 and 591 *Ler*-1 SVs were retained from ONT and Bionano technologies respectively. A total of 948 *Ler*-1 ONT SVs (80.1%) corresponded to 563 Bionano SVs (95.3%) leading to 563 common locations. The specific locations were scrutinized to assess improvement in SV detection by either technology. The ONT SVs were mostly detected near TE and gene features, and resistance genes seemed particularly impacted.

Conclusions: Structural variations linked to ONT sequencing error were removed and false positives limited, with high quality Bionano SVs being conserved. When compared with the Col-0 TAIR10.1 reference genome, most of the detected SVs discovered by both technologies were found in the same locations. ONT assembly sequence leads to more specific SVs than Bionano one, the latter being more efficient to characterize large SVs. Even if both technologies are complementary approaches, ONT data appears to be more adapted to large scale populations studies, while Bionano performs better in improving assembly and describing specificity of a genome compared to a reference.

Keywords: Structural variations, Oxford Nanopore technologies, Bionano genomics optical mapping, High molecular weight DNA, *Arabidopsis thaliana*

UNCORRECTED PROOF

*Correspondence: patricia.faivre-rampant@inrae.fr
[1] Université Paris-Saclay, INRAE, Etude du Polymorphisme des Génomes Végétaux EPGV, 91000 Evry-Courcouronnes, France
Full list of author information is available at the end of the article

Background

Structural variations (SV) are genomic variations involving segments of DNA from 50 bases to several megabases. SVs consist of unbalanced rearrangements such as copy

© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

number variations (CNV) including insertions/deletions (Indels) and presence/absence variations (PAV), and balanced events like inversions and translocations [1–4]. Several mechanisms explain the SVs formation, such as recombination errors generated by non-homologous end- joining and non-allelic homologous recombination, genome duplication and transposition [1, 2]. The structural variations in humans were largely studied and Ho et al. reviewed the impact of the SVs in human diseases [4]. In plants, it has been shown that the SVs play a key role in the evolution of genomes and are responsible for phenotypic variations by affecting Transposable Elements (TEs) and genes [3, 5–8]. In particular, SVs were found in stress related and resistance genes [9–13], leading to local adaptation [14, 15], or linked to other traits of agronomical interest such as tomato fruit flavor, rice grain size or poplar wood formation [16–18].

Nowadays, the identification of SVs contributes to the construction of the pangenome reference sequence or super pangenome [19, 20]. This new approach to build a reference will better reflect the genetic diversity of the species, and at the same time expand the understanding of genome evolution, as well as enhance the knowledge on adaptive traits [21–25].

The development of new sequencing technologies has boosted studies of SVs present in a genome, which were detected until recently only by Comparative Genomic Hybridation (CGH) arrays or single nucleotide polymorphism (SNP) [26–29]. The 3rd generation sequencing offers new opportunities to identify SVs at a larger scale with two approaches. One approach is based on linked short reads, as in 10x Genomics and Hi-C approaches [30], and the second by generating long reads, as proposed by Pacific Biosciences [31] and Oxford Nanopore Technologies (ONT) [32, 33]. These approaches provide access to complex regions, increasing their uses to improve genome assemblies and to detect structural variations in human [4, 34–37], in *Arabidopsis thaliana* ecotypes [24, 38, 39] and T-DNA insertion lines [40, 41] and in other plants [42–44]. In parallel, a technology based on physical map and developed by Bionano Genomics [45], generates information on very large DNA molecules. These maps, named optical maps, are frequently generated to improve and validate sequencing assembly, to detect SVs in animals genomes [36, 46–49] and more recently in plants [7, 42, 43, 50]. These 3rd generation technologies with combination possibilities made possible the identification of genetic rearrangements between individuals at intra specific levels [50, 51].

Comparisons between sequencing technologies or SV detection software are no longer uncharted territory [24, 36, 38, 52]. However, the comparison of ONT and Bionano was only performed in animals (Chimpanzee [49] and Drosophila [53]), but not yet in plants. Here, we investigated the genomes of two most studies ecotypes of *A. thaliana* (Col-0 and L*er*-1) obtained by both ONT and Bionano optical maps to compare the advantages of these two fundamentally different technologies, sequencing-based and physical map, to provide information on detection and characterization of SVs in plants.

Results

ONT sequencing and genome assembly

The ONT sequences of *Arabidopsis thaliana* ecotypes, Columbia (Col-0), here named as Evry.Col-0 and Landsberg *erecta* 1 (L*er*-1), here named as Evry.L*er*-1, were cleaned using the correction and trimming steps of Canu assembler [54]. A total of 9.8 Gb (N50 = 12.7 kb, 75X coverage) and 6.1 Gb (N50 = 16.5 kb, 47X coverage) were obtained for Evry.Col-0 and Evry.L*er*-1, respectively (Additional file 1: Tables S1 and S2).

Cleaned Evry.L*er*-1 ONT reads were aligned against the L*er* reference genome with Minimap2 to estimate ONT data completeness [38, 55]. In total, 98.9% of the L*er* reference genome was covered by the ONT Evry.L*er*-1 reads. The cleaned Evry.L*er*-1 reads were also mapped against the Col-0 TAIR10.1 reference genome achieving 95.2% of total genome coverage (Additional file 1: Table S3) [56]. Samtools *depth* tool [57] was then used on the Evry.L*er*-1 ONT reads mapping against the Col-0 TAIR10.1 reference genome to estimate the coverage at each position. The average coverage of 100 kb windows was 46.9X, with depth fluctuations in centromeric regions (Fig. 1).

To select the assembler that could produce a better output for our data, de novo assemblies for Evry.Col-0 and Evry.L*er*-1 were performed with Canu [54], RA [58] and SMARTdenovo (SDN, [59]). Based on general statistics (assembly size, contig number, N50 size), SMARTdenovo software generated better assemblies for both ecotypes compared to Canu or RA. (Additional file 1: Tables S4 and S5). Indeed, the SDN assemblies resulted in 79 contigs for Evry.Col-0 (cumulative size =117 Mb, N50 = 12.5 Mb with L50 = 5 contigs) and 101 contigs for Evry.L*er*-1 (cumulative sizes = 117 Mb, N50 = 10.7 Mb with L50 = 5 contigs). Assemblies using RA were more fragmented and chimeric contigs were identified with Canu assembler after MUMmer alignments on the reference chromosomes (Additional file 2: Figs. S1A-C and S2A-C). For all assemblers tested, centromeric regions were covered by many small contigs. These results were also supported by the alignments of the Evry.Col-0 and Evry.L*er*-1 assemblies on the respective reference chromosomes Col-0 TAIR10.1 and L*er*. The SDN were used to perform the subsequent SV analyses.

UNCORRECTED PROOF

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

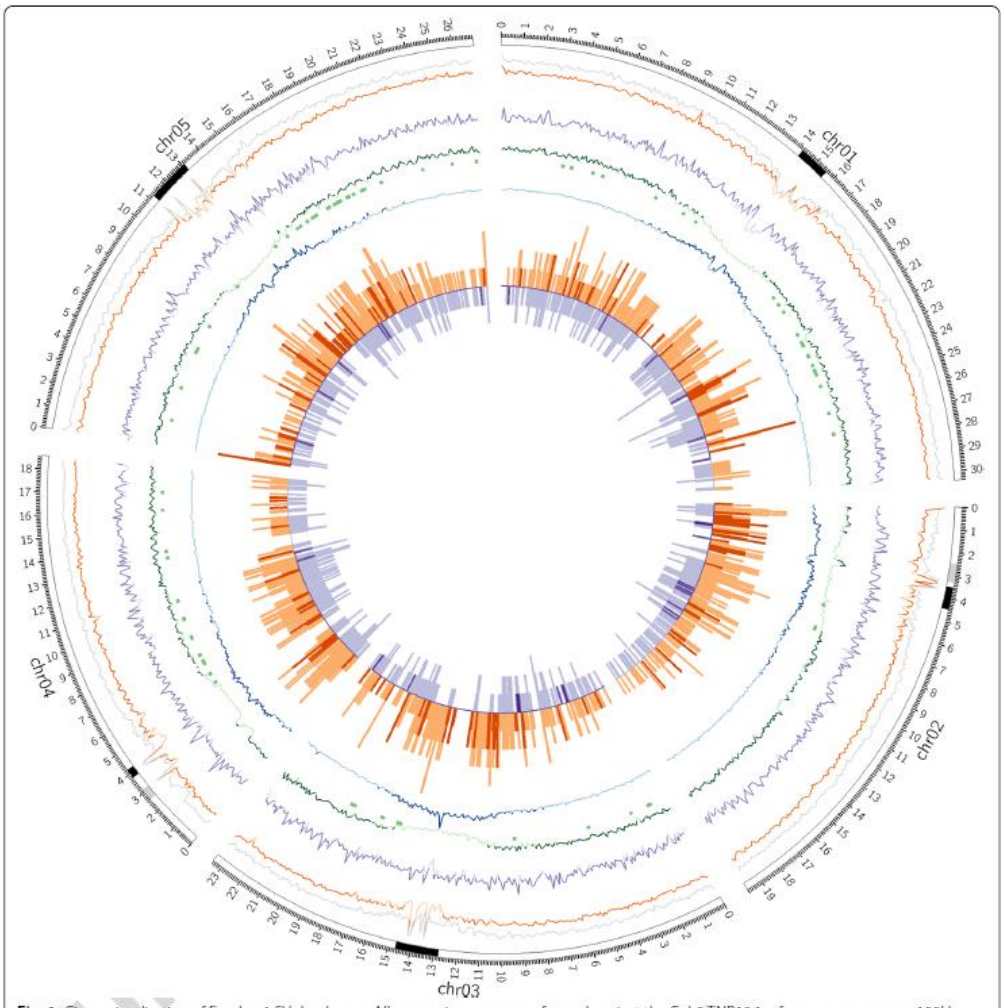


Fig. 1 Circos visualization of Evry.*Ler*-1 SVs landscape. All comparisons were performed against the Col-0 TAIR10.1 reference genome per 100kb bins. From external to internal layer (Circle1 to Circle7): Circle1: Col-0 TAIR10.1 chromosomes (ticks every 100 kb): black and light grey rectangles represent centromeric and NOR regions respectively; Circle2: Average mapping coverage for Evry.Col-0 ONT reads (grey line) and Evry.*Ler*-1 ONT reads (orange line) with dark orange if coverage > 46X; Circle3: DLE-1 label density as purple line (dark purple if density > 18 label per 100 kb); Circle4: Genes density as green line (dark green if density > 23), NLR Genes [73] indicated as green rectangles; Circle5: TEs density as blue line (dark blue if density > 58); Circle6: ONT SVs occurrences as orange outward bars (dark orange bars represent ONT- specific SVs); Circle7: Bionano SVs occurrences as purple inward bars (dark purple bars represent Bionano-specific SVs)

Optical maps generation

Genomic DNA was labeled using staining protocol with DLE-1 enzyme according to the manufacturer's protocol. One run per ecotype on the Saphyr device was performed resulting to 577.5 Gb and 610.9 Gb of molecules for Evry. Col-0 and Evry.*Ler*-1 respectively. Molecules larger than 150 kb were selected leading to about 600-fold final coverage based on the theoretical 130 Mb *Arabidopsis*

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

genome size (Additional file 1: Tables S6 and S7). A total of 17 and 14 optical maps with N50 of 14.6 Mb and 14.7 Mb were generated for Evry.Col-0 and Evry.*Ler*-1 respectively, leading to a genome size of 125 Mb for both ecotypes (Additional file 1: Tables S8 and S9).

The average label density of the Evry.*Ler*-1 optical maps was estimated at 18.47 per 100 kb (Additional file 1: Table S7). However, the DLE-1 density decreases in the centromeric regions due to molecule depth diminution and optical map breaks (Fig. 1, Additional file 2: Fig. S3A-E).

Structural variations detection

Structural variations detections were performed independently using the ONT and Bionano technologies data and were carried out in two ways: 1) Evry.*Ler*-1 versus Col-0 TAIR10.1 reference genome and 2) Evry.Col-0 versus *Ler* reference genome. The different types of structural variations detected in our study are described in Additional file 2: Fig. S4. We observed that general SVs characteristics (number, types and location) are similar in both ways, then only SV detection results from the Evry.*Ler*-1 assembly and optical maps against the Col-0 TAIR10.1 reference genome will be presented in detail. Description of SVs detected by comparing the SDN assembly and optical maps Evry.Col-0 with *Ler* reference genome are provided in Additional file 1: Tables S10-S14 and Additional file 2: Fig. S5A-E.

The sequence comparison of Evry.*Ler*-1 assembly to Col-0 TAIR10.1 reference genome using MUMmer *show-diff* utility [60] revealed 2186 potential SVs. A total of 119 SVs, called reference sequence junction (SEQ), break (BRK) and jump (JMP), found in centromeric, telomeric and nearby rDNA clusters, were considered to correspond to unresolved assembly regions into Evry.*Ler*-1 assembly compared to Col-0 TAIR10.1 reference genome and were filtered out (Additional file 1: Table S15).

The estimation of the ONT error sequencing rate was 4.0 and 4.9% for the Evry.Col-0 and Evry.*Ler*-1 of the trimmed corrected sequences respectively. Even if these error sequencing rates are inferior than previously described [61], to avoid false positive SV detection and to be comparable to Bionano technology, a filter on query ONT structural variations size (> 1 kb, SV detection size limit for high quality Bionano technology) was applied. On the 1184 SVs > 1 kb (54.2%), 591 insertions (INS), 581 deletions (DEL), 12 inversions (INV) were detected but no duplication (Table 1 and Fig. 2A).

A 5 Mb insertion in the Evry.*Ler*-1 assembly was detected on Chr3 Col-0 TAIR10.1 reference genome (14,272,986..14284724) due to a detection error of MUMmer in a complex region associated with a rDNA cluster. Thereby, this insertion was removed from the final data and not considered in the result. The Evry.*Ler*-1 ONT median size of the structural variations was 3455 bp and the cumulated size of 7.7 Mb. The SVs were equally distributed in size and number between INS and DEL. The INV categories had higher median and average sizes than INS and DEL. With a cumulated size of 0.3 Mb, INV represented 3.9% of the ONT variation size (Table 1). Structural variations were detected on all chromosomes, with a preferential location on chromosome arms and with no confident SV on the Chr1, 3 and 4 centromeres (Fig. 1).

Optical maps construction and SVs detection based on physical maps comparison was carried out on the Bionano Solve™ interface (Bionano Genomics, version 3.3). A total of 797 SVs were highlighted by comparing Evry.*Ler*-1 optical maps to in silico Col-0 TAIR10.1 reference genome labeling with DLE-1(Additional file 1: Table S15). When Bionano Solve tools detected one SV embedded in a second one, the largest SV was kept. This case was found on two Chr1 independent locations (INS:19432310..19468513 and DEL:24688666..24736849). A 1 kb size filter was applied on the Bionano SVs, which was equivalent to remove deletions and insertions with a Bionano quality score < 10 (defined as poor quality by the manufacturer) (Additional file 1: Table S16). Additionally, on Chr2, the INV SV (3,433,371..3490731) with no quality score was discarded. Thereby, 591 SVs representing 74.2% of total optical map Evry.*Ler*-1 SVs were further considered in this analysis. INS and DEL types constituted the main part of the optical map Evry.*Ler*-1 SVs (48.9 and 49.9% of the SVs respectively), the remaining

UNCORRECTED PROOF

Table 1 Characteristics of Evry.*Ler*-1 ONT and Bionano SVs, obtained after alignment against Col-0 TAIR10.1 reference genome

Technology	ONT				Bionano				
SV type	INS	DEL	INV	TOTAL	INS	DEL	INV	TRA	TOTAL
SV > 1 kb (%)	591 (49.9)	581 (49.1)	12 (1.0)	1184	289 (48.9)	295 (49.9)	5 (0.8)	2 (0.4)	591
Cumulated Size	3.4	4.0	0.3	7.7	2.9	2.3	1.6	0.4	7.2
Median Size	3358	3446	17,012	3455	4383	4296	166,007	189,454	4383
Average Size	5724	6801	26,865	6467	10,021	7885	310,470	189,454	12,104

Cumulated sizes are in Mb, Median and Average sizes in bp

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

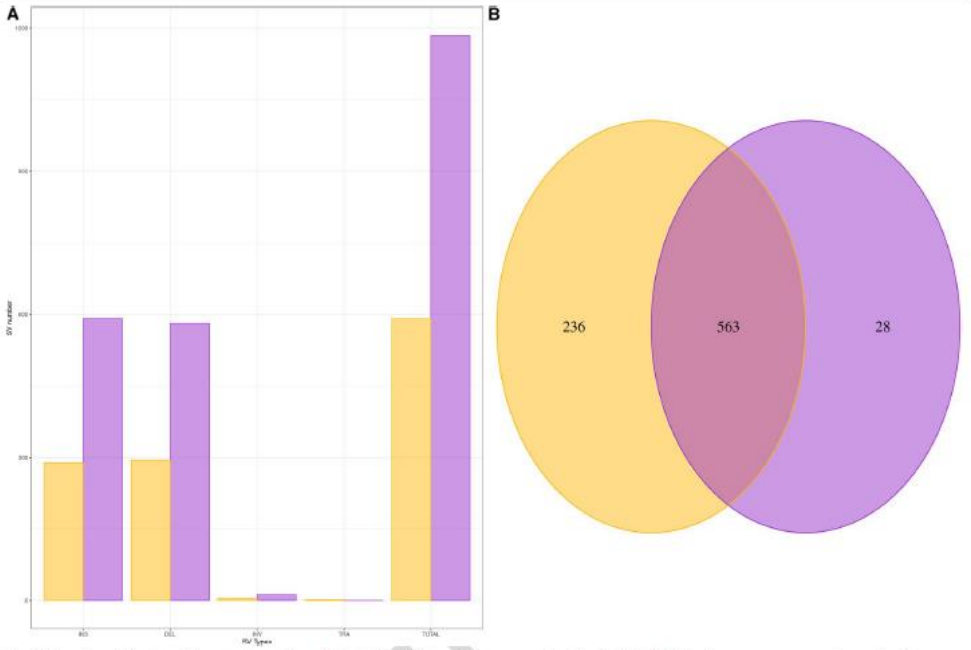


Fig. 2 Number of Evry.*Ler*-1 structural variations detected by ONT and Bionano against the Col-0 TAIR10.1 reference genome and overlaps in locations between the two technologies. The bars and circles colored in orange and purple correspond respectively to the ONT and Bionano technologies. **A** Barplot of SV number for insertions (INS), deletions (DEL), inversions (INV), translocations (TRA) and all SVs (TOTAL) obtained using ONT and Bionano technologies. **B** Venn diagramm of common and specific locations detected by ONT and Bionano technologies

1.2% corresponding to translocations (TRA) and INV (Table 1 and Fig. 2A). Median SVs size was 4383 bp and SVs cumulated sizes represented 7.2 Mb of the genome. The TRA and INV types corresponded to nearly one third (2.0 Mb) of the structural variations cumulated size. In our study, the translocation type was only detected using the Bionano assembly (Table 1 and Fig. 2A). The two Evry.*Ler*-1 TRA were located on Chr2 (3,378,844..3397121; 3,484,209..3844839) (Fig. 3A and Additional file 2: Fig. S3B). The largest SV identified was a 1.1 Mb Evry.*Ler*-1 INV located on Col-0 TAIR10.1 reference genome Chr4 (1,435,832..2593360) (Fig. 3B and Additional file 2: Fig. S3D). SVs were distributed preferentially along the chromosome arms and their detection was limited in centromeric regions due to decrease in labeling in these regions (Fig. 1).

(See figure on next page.)

Fig. 3 Focus of large structural variations (MU) located in complex locations. For each location, optical maps are colored in green for the Col-0 TAIR10.1 reference maps (ChrM for mitochondrial chromosome map) and light blue for Evry.*Ler*-1 maps. Consistent DLE-1 enzyme label between reference and Evry.*Ler*-1 maps are represented by dark blue bars with grey links between the genome maps. Inconsistent DLE-1 enzyme label are shown by yellow bars on the two genome maps. The purple bars represent the insertion events on the Evry.*Ler*-1 maps / read / assembly, and the black, yellow and pink bars correspond to deletions, inversions and translocations respectively. Araport11 annotation of the Col-0 TAIR10.1 reference (Genes and TE) and IGV view of the Evry.*Ler*-1 trimmed ONT reads and SMARTdenovo contigs minimap alignments are also presented. **A** Bionano Chr2 Evry.*Ler*-1 translocations against Col-0 TAIR10.1 reference genome (MU_153). **B** Bionano Chr4 Evry.*Ler*-1 extra-range size inversion against Col-0 TAIR10.1 reference genome (MU_097). **C** Bionano Chr4 Evry.*Ler*-1 large deletion against Col-0 TAIR10.1 reference genome (MU_102). **D** Bionano Chr5 Evry.*Ler*-1 inversion against Col-0 TAIR10.1 reference genome (MU_138)

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

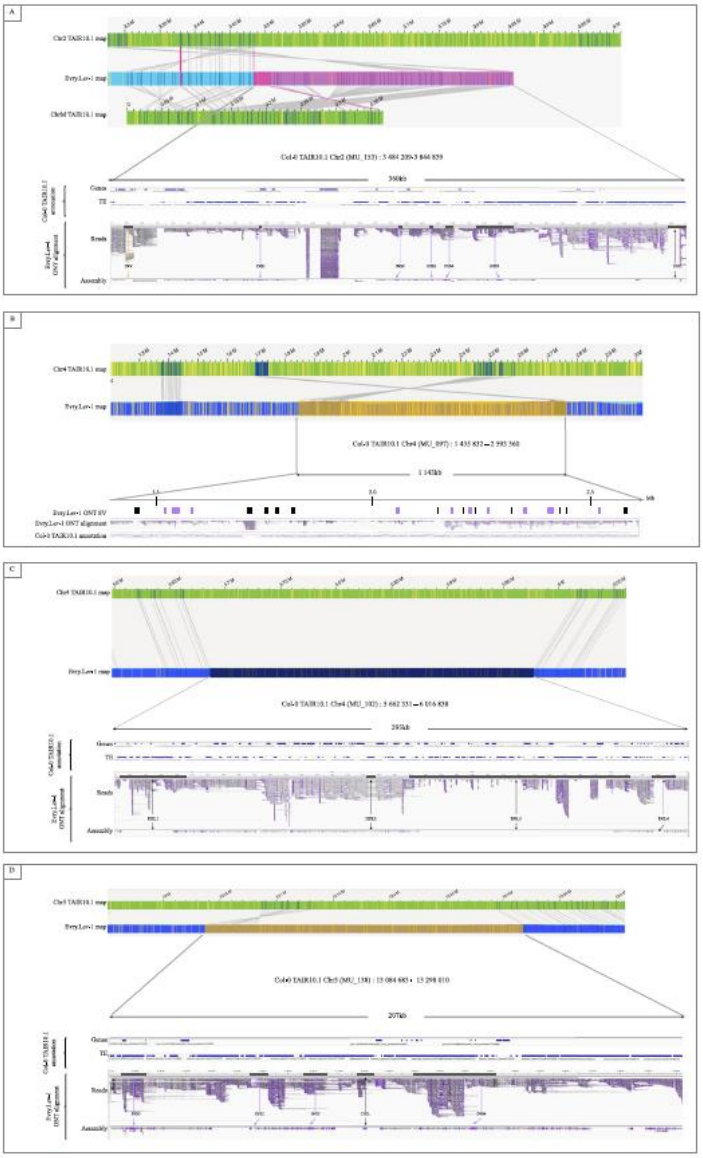


Fig. 3 (See legend on previous page.)

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

SVs comparison

SVs comparison was based on their absolute start- and end-positions on the Col-0 TAIR10.1 reference genome. We considered that structural variations locations were comparable in both technologies when their locations on Col-0 TAIR10.1 reference genome overlapped by at least 1 bp.

SVs comparison metrics are presented in Table 2 and the numbers of overlapping locations in Fig. 2B. A total of 563 common locations were identified representing 948 (80.1%) of Evry.*Ler*-1 ONT SVs and 563 (95.3%) of optical map Evry.*Ler*-1 SVs. The cumulated sizes of these common SVs were respectively 5.9 Mb and 6.9 Mb for ONT and Bionano detection representing 5.3% of the size of the Col-0 TAIR10.1 reference genome (based on 130 Mb) for ONT and 4.5% for Bionano. ONT SVs tended to be smaller than Bionano SVs (Table 2, Additional file 1 Tables S17 and S18).

To compare the median sizes of the ONT and Bionano variations (> 1 kb), we made notched boxplots including or not the large events (> 50 kb) (Fig. 4). Using the oriented Wilcoxon rank-sum test as it was performed by Dixon at *al.* (2018), *p*-values of the tests are all less than the significance level alpha = 0.05 therefore the median sizes of SV ONT are significantly smaller than the median sizes of SV Bionano. In addition, the sizes of the medians of all insertions and those of deletions detected using the Bionano technology were respectively 30.5 and 24.6% larger than with ONT. This last point is related to the fact that we applied a filter for ONT SVs (> 1 kb), thus increasing the median sizes for all categories.

To go further, SVs identified by ONT and Bionano technologies were assigned to a two letters svID code. The first letter used for ONT SVs and the second for Bionano SVs, leading to common (svID UU and MU) and specific (svID UN and NU) locations (with "U" for "Unique location", "M" for "Multiple locations" and "N" for "No location", Additional file 1: Tables S17 and S18).

Among the 563 common regions, 410 (72.8%) coincided with svID UU, i.e. one ONT structural variation corresponding to one SV Bionano. For 364 (88.8%) of the sv ID UUs the overlap of these locations was 100% and for 30 (7.3%) greater than 50%. Only 16 (3.9%) svID UUs had less than 50% overlap (Additional file 1: Table S17). Moreover, 405 (98.8%) of the svID UU SVs have "conforming" type (i.e. have the same type) (Additional file 1: Table S17) and five svID UU (1.2%) were identified as deletions by ONT and insertions by Bionano technologies (svID UU_035, UU_038, UU_057, UU_073, UU_358; Additional file 1: Tables S17 and S18).

The remaining 153 (27.2%) common locations corresponded to 538 Evry.*Ler*-1 ONT SVs (56.8% of commons ONT SVs) related to 153 Evry.*Ler*-1 optical map SVs (27.2% of commons Bionano SVs) (Table 3).

These structural variations had a svID MU ranging to 2 (representing 59.5%) to 22 ONT SVs for one Bionano SV. The cumulative size of this SVs category was approximately 4 Mb for both technologies although the number of ONT variants is 3.5 times higher than in Bionano (538 vs 153). The size distribution of these SVs started from 1 kb (due to the filter applied) to 87 kb and 1.1 Mb respectively for ONT and Bionano. Furthermore, Bionano median and average sizes were 2 and 4 fold larger respectively. Unlike the svID UU, the type of the svID MU was "conforming" for only 68 (44.5%) locations of which 58 (85.3%) corresponded to 2 ONT SVs for 1 Bionano SV. The remaining 10 (14.7%) locations comprised 3 or 4 ONT SVs for one Bionano SV.

The largest ONT SV was included in a complex SV (svID MU_102) consisting of four contiguous deletions located on Chr4. These four deletions coincided with one Evry.*Ler*1 optical map deletion (Fig. 3C, Additional file 1: Tables S17 and S18). The largest Evry.*Ler*1 optical map SV (svID MU_097) was an inversion on Chr4 of 1,143,224 Mb overlapping 22 Evry.*Ler*-1 ONT SVs (corresponding to INS and DEL) (Fig. 3B, Additional file 1: Tables S17 and S18). To

Table 2 Characteristics of Evry.*Ler*-1 ONT and Evry.*Ler*-1 optical map SVs identified in common and specific Col-0 TAIR10.1 reference locations

Technology	ONT		Bionano	
	Common	Specific	Common	Specific
Locations	563	236	563	28
SVs > 1 kb (%)	948 (80.1)	236 (19.9)	563 (95.3)	28 (4.7)
Min Size	1003	1003	1034	1017
Max Size	87,533	347,239	1,143,224	166,007
Cumulated Size	5.9	1.8	6.9	0.3
Median Size	3759	2656	4456	1374
Average Size	6221	7453	12,171	11,104

Cumulated sizes are in Mb, and all other sizes in bp

(See figure on next page.)

Fig. 4 Size distribution and median comparison of ONT and Bionano SV. All p-values were obtained with a two-sided oriented Wilcoxon rank-sum test. Hypothesis H0 was "median of ONT SV size is less than Bionano one". ONT and Bionano boxplots are colored in orange and purple respectively. Medians are represented by red dots. **A** Boxplot of ONT (*n*=1184) and Bionano (*n*=591) SV>1kb. **B** Boxplot of ONT (*n*=1169) and Bionano (*n*=573) 1kb<SV<50kb. **C** Boxplot of ONT (*n*=591) and Bionano (*n*=289) INS>1kb. **D** Boxplot of ONT (*n*=588) and Bionano (*n*=282) 1kb<INS<50kb. **E** Boxplot of ONT (*n*=581) and Bionano (*n*=295) DEL>1kb. **F** Boxplot of ONT (*n*=571) and Bionano (*n*=288) 1kb<DEL<50kb

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

UNCORRECTED PROOF

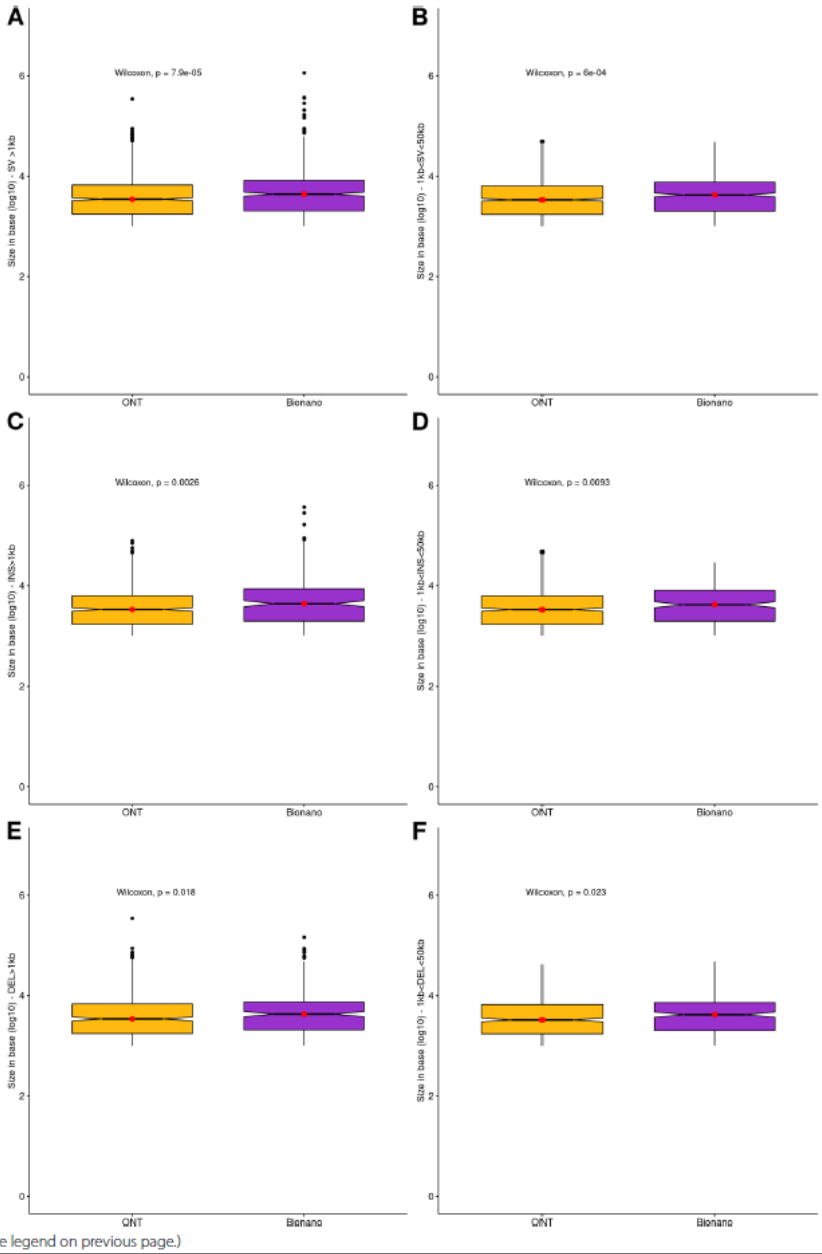


Fig. 4 (See legend on previous page.)

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

Table 3 Characteristics of the svID MU identified in ONT and Bionano SVs

Technology	ONT	Bionano
Location	153	153
Number	538	153
Min Size	1010	1253
Max Size	87,533	1,143,224
Cumulated Size	3.9	4.4
Median Size	4236	9523
Average Size	7406	28,734

svID MU corresponds to locations where Multiple ONT SVs overlap a Unique Bionano SV location. Cumulated sizes are in Mb, and all other sizes in bp

enrich the list of the large (> 50 kb) Bionano SV, the svID MU_138, an INV of 207 kb was located on the Chr5 and covered 5 ONT structural variations (4 INS and 1 DEL) (Fig. 3D, Additional file 1: Tables S17 and S18).

Specific locations were more abundant with the ONT technology (236 SVs - svID UN, SV detected with ONT only - 19.9%) than with Bionano (28 SVs - svID NU, SV detected with Bionano only - 4.7%) leading to a cumulated size of 1.8 Mb and 0.3 Mb respectively, and with a median size twice larger (2656 bp for Evry.*Ler*-1 ONT SVs vs 1374 bp for Bionano Evry.*Ler*-1 optical map SVs). The distribution of the specific Evry.*Ler*-1 ONT SVs onto the Col-0 TAIR10.1 reference chromosomes led to a clear trend to locate on NOR and centromeres (Fig. 1). The largest specific ONT variant was located on Chr3 and corresponded to a DEL (svID UN_124, Additional file 1: Table S17). The largest specific Bionano SV was spotted on the Chr3 and corresponded to an INV type (svID NU_017, Additional file 1: Table S18, Additional file 2: Fig. S3C). A focus on the TRA located on Chr2 revealed 18.2 kb specific Evry.*Ler*-1 optical map SV (svID NU_007), close to the second TRA of 360 kb (MU_153). This last TRA (MU_153) coincided with seven SV events (1 INV, 5 INS and 1 DEL) in the Evry.*Ler*-1 assembly (Fig. 3A, Additional file 1: Tables S17 and S18).

Using Araport11 annotation of the Col-0 TAIR10.1 reference genome (The Arabidopsis Information Resource – TAIR), a comparison using only Evry.*Ler*1 ONT SVs is shown in Table 4. Since the Evry.*Ler*-1 optical map events represented a large-scale observation, they were not taken into account in this analysis. A total of 893 (75.4%) out of 1184 Evry.*Ler*1 ONT SVs overlapped TE features, of which 579 also overlapped genes. Only 291 (24.6%) Evry.*Ler*-1 ONT SVs were located outside a TE feature, overlapping genes [125 (10.6%)] or not [166 (14.0%)] (Table 4). Focusing on Evry.*Ler*-1 ONT specific SVs, their overlap with the Col-0 TAIR10.1 reference annotation showed a similar percentage compared to the common SVs.

To better characterize the genes affected by ONT SVs in common locations, a GO-terms overrepresentation test was performed with the PANTHER's tool [62] available on TAIR website (https://www.arabidopsis.org/tools/go_term_enrichment.jsp). Among the 1764 genes identified in common locations, 47.2% (832) genes were uniquely assigned to a GO term and used in PANTHER (Additional file 1: Tables S19 and S20). Overrepresentations in defense response and ADP-binding terms were detected (Additional file 1: Table S21), but no enrichment for GO-terms in genes in specific ONT locations was highlighted (Additional file 1: Tables S22-S24).

A summary of the main comparison criteria between the two technologies is presented in Table 5. It appears that the ONT and Bionano technologies (with DLS labeling) were equally effective in detecting SVs of less than 50 kb and those in gene regions. In our study, Bionano was more efficient on large events while additional analyzes for the detection of these variations with ONT are necessary.

Discussion

Herein, we compare the performance of Oxford Nanopore and Bionano Genomics technologies for structural variation detection. For this, we performed long read sequencing and optical mapping of two *A. thaliana* ecotypes, namely Columbia-0 (Col-0) and Landsberg *erecta* 1 (*Ler*-1). Long read de novo assemblies were constructed using three different assemblers and optical maps were assembled with Bionano Solve tools.

Table 4 Evry.*Ler*-1 ONT SVs (> 1 kb) overlapping Col-0 TAIR10.1 reference genes and TEs annotation features

Features		noTE		TE		TOTAL (%)
		noGENE	GENE	noGENE	GENE	
Common SV	UU	79	59	93	179	410 (34.6)
	MU	59	38	150	291	538 (45.5)
Specific SV	UN	28	28	71	109	236 (19.9)
SV number (%)		166 (14.0)	125 (10.6)	314 (26.5)	579 (48.9)	1184
TOTAL (%)		291 (24.6)		893 (75.4)		1184

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

UNCORRECTED PROOF

Table 5 Summary of comparisons of ONT assembly and Bionano Optical mapping (DLS labeling) for SV detection

Technology	ONT	Bionano
Assembly/Optical map obtention	√√	√√
1 kb < SV < 50 kb		
Deletion	√√	√
Insertion	√√	√
Inversion	√	√√
Translocation	NA	√
SV > 50 kb		
Deletion	√	√√
Insertion	√	√√
Inversion	–	√√
Translocation	NA	√√
SV location		
Genic	√√	√√
Complex	√	√√
Acces to the SV sequence	√√	NA
Bioinformatic skills	√	√√
SV visualization	√	√√

√√ Robust detection or user friendly. √ Detection depending on variables such as coverage, contig length and label density or need of bioinformatic skills. NA: Not available; – Undetectable

Structural variations detected using the Col-0 TAIR10.1 [56] and L*er* [38] genomic sequences as references, were described and compared to each other, to reveal the relative strengths of the two technologies in detecting SVs.

Assemblies based on ONT and Bionano data for SV analyses

To obtain the best assembly based on only long reads data we used three different assemblers. After comparison of assembly metrics, calculation time and collinearity against reference genomes, SDN provided the best assembly even if some collinearity breaks were observed, especially in centromeric regions. The metrics of Evry. Col-0 and Evry.L*er*-1 SDN assemblies were comparable to such assemblies in previous studies [24, 38, 39, 63] but remained underestimated.

Continuous improvement in protocols and new developments in genome assembly strategies and algorithms resulted in a higher quality of genomic sequences used in subsequent analyses. Previously published Bionano *A. thaliana* optical map (KBS-Mac-74 genome [39]) used a BspQI staining protocol for labeling, generating about 10 times more maps to cover the entire genome of the KBS-Mac-74 ecotype than in our study (DLE-1 Bionano staining protocol), highlighting enhancement in Bionano's protocol. In addition, no optical map was previously available for the Columbia (Col-0) and Landsberg *erecta* 1 (L*er*-1), making our map assemblies especially valuable for further studies.

Our high quality optical map allowed us to define centromeric and nucleolar organizer regions (NOR), despite lower molecules density and even if label concordance loss were observed between Evry.L*er*-1 maps compared to the Col-0 TAIR10.1 in silico reference maps. Moreover, fluctuations in ONT coverage density and accumulation of repetitive alignments in the same regions are reinforcing evidence of the approximate locations of the centromeres and NOR. However, we identified several misassemblies in the course of our SVs analyses between the Evry.L*er*-1 SDN assembly and Col-0 TAIR10.1 reference genome, highlighting how difficult it can be to get a reliable assembly, and thus detecting SVs, in these complex regions.

SV detection and comparison between the two technologies

We compared structural variations in Evry.L*er*-1 and the reference genome Col-0 TAIR10.1. We chose this reference because of its high quality and the richness of the associated studies [24, 38, 39].

The cumulated SVs sizes obtained for ONT and Bionano in our study are smaller than in previous studies [24, 38]. Filtering on SVs size (SVs > 1 kb) vs no size filter could explain this difference. In addition, the lack of duplications detection in ONT assembly could depend on MUMmer's ability to detect this type of SV, reflecting the detection complexity of the duplication events, as mentioned in Goel et al (2019). In contrast, the absence of duplication detected by Bionano could be explained by polymorphic duplications between Evry.L*er*-1 maps and Col-0 TAIR10.1 reference genome, which would break the collinearity, as described in Jiao and Schneeberger (2020), and by the size of duplications (< 5 kb, [24, 63]) identified as the limit of Bionano detection.

Analyzes by the two technologies revealed a predominance of insertion, deletion and inversion with larger median and average sizes for Bionano SVs. The distribution of these types of SV is homogeneous along the chromosome arms. Most of the specific ONT SVs are located in the centromeric and pericentromeric regions. Nonetheless, a decreased coverage of the SVs in these regions was observed, in opposition previous report by Pucker et al. (2019), it can be assumed that this is probably due to technical problems such as assembly errors (for ONT SMARTdenovo) [64]. This diminution in SV coverage is also observed with Bionano technology, showing a lower density labeling in these complex regions. This contrasts previous results identifying more SVs in regions where the recombination meiotic rate decreases [24]. The filtering of SV

UNCORRECTED PROOF

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

ONTs smaller than 1 kb could again be an explanation for this contradiction. On the other hand, Bionano Solve tools well identified translocation previously characterized on Chr2 and three inversions larger than 50 kb present on Chr3 (NU_017), Chr4 (MU_097) and Chr5 (MU_138) [24, 38, 64]. For example, compared to the Col-0 TAIR10.1 reference genome, the Evry.L*er*-1 maps support a 360 kb translocation of mitochondrial sequence in the Chr2 around the 3.6 Mb Col-0 TAIR10.1 position (svID MU_153). This observation is concordant with Stupar et al. (2001) that first described the mtDNA insertion in the Col-0 TAIR10.1 reference genome [65]. In the same Chr2 region (3.29 Mbp to 3.48 Mbp, Pucker et al. (2019) identified a second 300 kb highly divergent region between *A. thaliana* Nd-1 and Col-0 TAIR10.1 reference genome. In the same study, Pucker et al. also described the lack of the entire region between 3.29 Mbp and 3.48 Mbp in L*er* reference genome, corresponding to the specific translocation of 18.2 kb detected in Evry.L*er*-1 map (svID NU_007). Zooming in this Col-0 TAIR10.1 Chr2 region (3.2 Mb to 3.5 Mb) in the Evry.L*er*-1 SDN assembly, many small contigs are observed with a missing sequence of 110 kb. This observation explains the absence of SV detection, confirming the great complexity of this region and the sequence divergence between L*er*-1 and Col-0 genome described by Pucker et al (2019). Even if the Col-0 reference genome has been improved since 2000, it remained gaps and misassemblies as largely reported in many studies [41, 56, 63, 64, 66]. A combination of the best Col-0 TAIR10.1 sequence and the new high quality optical map data obtained in this study will provide valuable resources to re-evaluate complex region assembly.

The svID MU structural variations result either from a too low density of the DLE-1 sites, or from a high divergence of genomic regions between the two ecotypes. In both cases, experimental validations are essential to validate the number and type of SVs. Nevertheless, the fact that the largest events described (MU_097 (Chr4 INV), MU_102 (Chr4 DEL), MU_153 (Chr2 ONT SVs matching the second Bionano translocation) and MU_138 (Chr5 large inversion)) were retrieved in our study, is like a proof of concept of the ONT and Bionano technologies and the parameters used for the analysis.

Comparing locations of the Evry.L*er*-1 ONT SVs with Araport11 annotations, we found that common and specific ONT SVs were preferentially linked to TE features and genes, as reported in Jiao and Schneeberger (2020). Looking at the GO-term enrichment in genes overlapping common ONT SVs, an overrepresentation in defense response and ADP-binding terms corresponding to resistance genes was observed. This result is concordant with previous studies [13, 24, 38, 67–69] in which an association between structural variations and the cluster organization of resistance genes was described.

General conclusion

Because analyses of SV locations and their consequences heavily rely on the quality of their identification and the underlying assembly/mapping data, we aimed to compare the performance of ONT and Bionano technologies for structural variation detection. Applying stringent filters on ONT assembly mapping approach and size filters on SVs, we have shown this methodology is an easy and efficient way to detect reliable SVs. Most of the detected SVs were also identified with Bionano optical maps with high concordance despite different characteristics (average, size, median). Nevertheless, long read sequencing technologies make it possible to detect SVs more accurately, while Bionano offers a broad overview of structural rearrangements. Thereby, the choice of technology has to be based on the characteristics of the locations to be studied. If these locations are known to be gene regions without repeated sequences, the analysis of an ONT assembly will be reliable and provide more confidence in the SVs locations. Bionano's interest will then be minimal. In contrast, if these regions are identified as being complex (areas rich in transposable elements for example) the analysis of structural variations from an ONT assembly will be more delicate since the assembly itself and the alignments of the detection will be less reliable in these locations. ONT analyzes from these regions cannot be taken at face value and will require validation (targeted experimentation by labeling, PCR, detection of these SVs by other technology, progeny analysis ...). On the other hand, Bionano technology is effective in validating variation in these large complex regions. Combined with Bionano analyzes which provide an overview and point to these areas, ONT analyzes and associated results gain in value. The major limit to Bionano is the lack of access to the sequence information. In addition, whole genome SVs analyses are currently mostly limited to model organisms. However, Oxford Nanopore long reads and Bionano Genomics optical maps assemblies do not require previous knowledge on the genomic architecture or the sequence of the studied organism, this approach expands the field of suitable plant species or species complexes where in-depth SVs analyses can be performed. Unlike in animals, in plants, the heterogeneity and size of genomes, polyploidy, heterozygosity and the sequence references of species which are sometimes very different and potentially of low quality make population analyzes difficult if not impossible. Therefore, population analysis using Bionano is only possible when the reference is of very high

UNCORRECTED PROOF

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

quality and genomically very close to other ecotypes. On the other hand, these plant characteristics have less impact on the detection of variations by ONT, which is much more local with this technology.

ONT appears to be especially suitable to carry out plant population analyses and Bionano more relevant to study plasticity of genome structure, leading to an obvious complementarity of these two technologies in SVs analysis.

Methods

Plants

Arabidopsis thaliana Columbia-0 (accession number 186AV) and Landsberg *erecta*-1 (accession number 213AV) seeds were provided by the Versailles *Arabidopsis* Stock Center (National Research Institute for Agriculture, Food and Environment, Versailles, France, http://publiclines.versailles.inra.fr/). They were sown directly in soil and transplanted after 10 days. Plantlets were grown under a 16 h light/8 h night photoperiod in a growth chamber at 20 °C for 4–5 weeks. Before to harvest, the plants were dark-treated for 3 days.

Oxford Nanopore sequencing (MinION) HMW DNA extraction

High Molecular Weight (HMW) DNA extraction was performed using a modified salting-out protocol. A total of 5 g of freshly harvested leaves was ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle and transferred to 10 ml of 50 °C prewarmed extraction buffer in a 50 ml tube containing 1.25% SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM EDTA, 0.01% w/v PVP40. Then 37.5 µl of beta-mercaptoethanol (0.375% final) and 10 µl RNAse A (Qiagen® 100 mg/mL) were added. This solution was incubated for 30 min at 50 °C, under agitation (10 s at 300 rpm every 10 min). After incubation, 20 ml TE (10:1) were added, slowly homogenized then 10 ml of KAc 5 M. The tube was kept on ice for 5 min, then centrifuged at 4 °C during 10 min at 500 g. The solution was transferred in two 15 ml tubes and centrifuged again as previously. The supernatant was transferred in a 50 ml tube containing 1 volume of Isopropanol, slowly inverted 10 times, then centrifuged at 4 °C for 10 min at 5000 g. Pellets were washed with 20 ml ethanol 70% then centrifuged at 4 °C for 5 min at 5000 g. Supernatant was removed and pellets were not completely dried before solubilization in 100 µl of TE (10:1) prewarmed at 50 °C. The DNA solution was then incubated at 50 °C for 10 min. Field Inverted Gel Electrophoresis (Program 50–150 kb on *Pipin Pulse* from Sage Science) was used for DNA size estimation and DNA samples with molecule size above 50 kb were kept. Purity of DNA was evaluated by spectrophotometry (OD260/280 and OD260/230 ratio).

Bionano optical maps ultra HMW DNA extraction

We performed the DNA extraction using the Base protocol n°30,068 vD (Bionano Genomics) with minor adaptations. Three grams of very young fresh leaves from each genotype were harvested from the dark-treated rosettes. The samples were placed on aluminium foil on ice then transferred to a 50 ml tube surrounded by a screened cap allowing pouring without loss of samples (Bio-Rad) The tubes were kept on ice during the nuclear isolation. Samples were treated in a fixing solution containing 2% formaldehyde under a fume hood then rinsed with fixing solution without formaldehyde. Fixed-leaves were transferred to a square Petri dish with 4 ml of Plant Homogenization Buffer plus (HB+ is HB supplemented with 1 mM spermine tetrahydrochloride, 1 mM spermidine trihydrochloride, and 0.2% 2-mercaptoethanol). Entire leaves were chopped with a razor blade in 2x2mm pieces then transferred to a new tube on ice and 7.5 ml HB+ is added. Using TissueRuptor (Qiagen) the 2x2mm pieces were blended for a total of four cycles (20 s at maximum speed then resting 30 s). Plant homogenates were filtered, first through a 100 µm then to a 40 µm cell strainer and volumes were adjusted to 45 ml. Nuclei were centrifuged at 3840 g at 4 °C during 20 min, supernatants were discarded. Nuclei were gently re-suspended in residual buffer, 3 ml of HB+ were added, then tubes were swirled on ice and the volumes were adjusted to 35 ml. Homogenates were centrifuged at 60 g at 4 °C during 3 min using minimum deceleration. Solutions were very carefully transferred to a new tube in order to avoid carry-over of debris, and filtered again through a 40 µm cell strainer. Nuclei were centrifuged at 3840 g at 4 °C during 20 min, 3 ml of HB+ were added and tubes were swirled on ice. Using Bionano Nuclei Purification by Density Gradient, nuclei homogenate was laid on the top of two solutions with different densities. After a 4500 g centrifugation at 4 °C during 40 min, the nuclei are at the interface of the two solutions. There are recovered with a wide-bore tip in about 1 ml solution and transferred in a 15 ml tube and adjusted to 14 ml with HB+. Nuclei were centrifuged at 2500 g at 4 °C during 15 min. All the buffer was removed and nuclei were re-suspended in 60 µl HB+.

The nuclei solution was adjusted to 43 °C for 3 min and melted 2% agarose from CHEF Genomic DNA Plug Kits (Bio-Rad) was added to reach a 0.82% agarose plug concentration. Plugs were cooled on aluminum blocks refrigerated on ice. Purification of the plugs was performed with Bionano Lysis Buffer adjusted to pH 9 and supplemented with proteinase K and 0.4% 2-mercaptoethanol. Plugs were digested during 2 h at 50 °C in Thermomixer then the solution was refreshed and incubated again overnight. Plugs were treated with RNAse for 1 h at 37 °C in the remaining solution. Plugs were washed three times

UNCORRECTED PROOF

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

in Wash Buffer (Bionano Genomics) then four times in TE 10:1. DNA retrieval was performed as recommended by Bionano Genomics, as follow: plugs were melted at 70 °C during 2 min then transferred immediately at 43 °C and incubated 45 min at 43 °C with 2 µl Agarase (0.5 unit/µl). The melted plugs were recovered with wide-bore tips and dialyzed on a 0.1 µm membrane disk (Millipore) floating on 10 ml TE for 1 h. DNA was quantified in triplicates with Qubit according to Bionano protocol. Two methods were used to estimate the size of DNA molecules: *Pipin Pulse* and the Qcard Argus System (Opgen) which allows DNA combing on a lane and visualization of molecules after staining under fluorescent microscope. Samples with molecules above 150 kb were kept for labeling. Protocols were performed according to Bionano Genomics with 600 ng of DNA for both Col-0 and L*er*-1 ecotypes. The direct label and stain (DLS) labeling consisted of a single enzymatic labeling reaction with DLE-1 enzyme following by DNA staining with a fluorescent marker. It was performed with 750 ng DNA. Chip loading was performed as recommended by Bionano Genomics.

ONT sequencing (MinION) and assembly

ONT libraries were prepared according to the following protocol, using the Oxford Nanopore SQK-LSK109 kit. Genomic DNA or DNA previously fragmented to 50 kb with a Megaruptor (Diagenode S.A., Liege, Belgium) was first size-selected using a BluePippin (Sage Science, Beverly, MA, USA). The selected DNA fragments were end-repaired and 3′-adenylated with the NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The DNA was then purified with AMPure XP beads (Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) and ligated with sequencing adapters provided by Oxford Nanopore Technologies (Oxford Nanopore Technologies Ltd., Oxford, UK) using Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB). After purification with AMPure XP beads, the library was mixed with Running Buffer with Fuel Mix (ONT) and Library Loading Beads (ONT) and loaded on 4 MinION R9.4 SpotON Flow Cells per *Arabidopsis thaliana* ecotypes. The resulting FAST5 files were base-called using albacore (versions 2.1.10 and 2.3.1) and FASTA produced as described in Istace et al (2017). Canu version 1.5 (github commit ae9eecc), was used for initial read correction and trimming with the parameters minMemory = 100G, corOutCoverage = 10,000. The corrected sequences were merged in one final FASTA file per ecotype that was later used as assemblers'input.

Assemblies were performed with the relevant genome size parameter set to, or coverage calculation based on, a 130 Mb genome size. Assemblers used with default parameters were Canu version 1.5 ([54], github commit 69b5f32), Rapid Assembler (RA, [58], https://github.com/lbcb-sci/ra commit 07364a1) and SMARTdenovo version 1.0 (with the option –c 1 to run the consensus step) ([59], https://github.com/ruanjue/smartdenovo commit 61cf13d). The MUMmer suite version 3.0 [60] was run with the parameters used in Zapata et al. 2016 [38]. To analyze the assemblies, they were aligned to the reference genome of *Arabidopsis thaliana* using *nucmer* with the options -c 100 -b 500 -l 50 -g 100 -L 50. The TAIR10.1 reference genome for *A. thaliana* Columbia 0 (Col-0, GCF_000001735.4) was chosen as it is the available sequence with the latest annotation. As Pucker et al. (2019) hightlighted, the nuclear sequence is the same as the TAIR9 reference genome but chloroplastic and mitochondrial sequences were added that were necessary to detect translocation with Bionano technology. The reference genome of *Arabidopsis thaliana* Landsberg *erecta* was the one published by Zapata et al. in 2016 (L*er*, Genbank LUHQ00000000.1, [38]). The alignments were filtered with *delta-filter* (options – 1 -l 10,000 -i 0.95) and visualized with the *mummer-plot* (options --fat --large --layout –png) or DNAnexus (github commit 78e3317). These MUMmer parameters [38] allowed conserving exact matches larger than 50 bp and alignments longer than 10 kb with a minimal identity of 95%. To check assemblies completeness and fragmentation, they were compared to each other based on the metrics (Number of contigs, N50, cumulative genome sizes) and the genome alignments to the references generated with MUMmer viewed with the DNAnexus dot (https://dnanexus.github.io/dot/).

To evaluate the completeness of our ONT data, mapping of the corrected ONT reads on the Col-0 TAIR10.1 reference genome were performed with Minimap2/2.15 aligner [55] with -a -x map-ont parameters. The Samtools/1.6 depth tool with –a option [57] gave us the alignment depth at each Col-0 TAIR10.1 reference position. The error sequencing rate was inferred from the identity rate percent obtained by aligning the Evry.Col-0 and Evry.L*er*-1 trimmed corrected ONT reads on the Col-0 TAIR10.1 and L*er* reference genomes respectively.

Bionano optical map assembly

As it can be beneficial for assembly steps, molecules subsampling was conducted when flowcells yielded more than 90 Gb and 600X of data. This adapted selection of molecules was made on each run with the Bionano RefAligner tool in command line (version 1.3.8041.8044 with –minlen 180 –randomize 1 –subset 1 nb_molec options) or with Bionano Access (version Solve3.3 with Filter Molecule Object utility) (Additional file 1: Tables S6 and S7).

Maps were then constructed with the tool *Generate* de novo *Assembly* of the Bionano Solve™ (Bionano Genomics, version 3.3) using the options recommended

UNCORRECTED PROOF

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

by Bionano (With pre-assembly, Non haplotype without extend and split) and a 0.115 Gb genome size. The pre-assembly step calculates noise parameters that optimize the quality of the assembly (less and larger maps). When a reference FASTA file is added, noise parameters are calculated in aligning the molecules to the reference. Otherwise, the noise parameters are estimated thanks to a first rough assembly of the molecules. For Col-0 and L*er*-1 ecotypes, three maps were obtained, one without reference, one with the Col-0 TAIR10.1 reference genome and one with the L*er* reference genome (Additional file 1: Tables S8 and S9). In our study, the metrics of these assemblies are very similar. This stability reflects that noise parameters estimated either with references fasta sequences or our data, were comparable. This is a guaranty of the quality of Bionano data and assemblies.

ONT variation detection

Structural variations were obtained with MUMmer's show-diff utility on the filtered alignments of SMARTdenovo assemblies against the reference genomes Col-0 TAIR10.1 and L*er*. One DIFF file per comparison was obtained. Six SV types (Gap, Duplication, Break, Jump, Inversion, Sequence) were described in the Additional file 2: Fig. S4.

Bionano variation detection

SVs detections were performed on the optical maps built with the public reference and our SMARTdenovo ONT assemblies using the tool Convert SMAP to VCF file. VCF files were recovered, describing all the structural variations between the optical maps and the considered reference. The variations were classified into four types: deletion, insertion, translocation and inversion. SVs detection stringency is intrinsic, based on the number of aligned molecules (at least nine by default) and the number of labels across each variants breakpoint on the genome map (at least two by default) (Bionano tutorial: https://bionanogenomics.com/support-page/data-analysis-documentation/). The technology gave an interval with uncertainty about breakpoint positions (CIPOS and CIEND in VCF files). In this study, these values were used to calculate the most extended positions for the Bionano SVs and avoid the effect of label fuzz.

The low number of structural variations between Evry. Col-0 optical maps and the Col-0 TAIR10.1 reference genome (as Evry.L*er*-1 optical maps and L*er* reference genome) reflects the good collinearity between the maps and the references (Additional file 1: Table S25). SVs gave us an indication of the location of conflicts that could be due to mis-assemblies or intra-ecotype variations. Inter-ecotype detection allowed us to describe the variations between Evry.Col-0 and Evry.L*er*-1.

Quality and length characteristics were used to better describe and filter SVs. Bionano Solve associates a quality score to each INS and DEL based on sensitivity and the fraction of alternative calls in mix assemblies that were called in the alternative genome assembly [from no quality (.) or poor (0) to confident quality (20)]. We observed that this indicator follows the same trend as the SVs size (Additional file 1: Tables S11 and S16). Moreover, size range values where SVs abundances are very different between both technologies at the extremes: the smallest (< 1 kb), where ONT technology detected much more SVs and the highest (> 5 kb) where Bionano technology detected proportionally more SVs. In our comparison analysis, to remove poor quality Bionano SVs, ONT sequencing errors and high sensitivity, a filter on query SV size (> 1 kp) was applied. Confidence scores for translocation and inversion breakpoints were computed as *p*-values, giving true confidence (in Mahalanobis distance) to positive calls. The recommended cutoffs are 0.1 and 0.01 for translocation and inversion breakpoints calls respectively and were used to eliminate uncertain inversion on Chr2.

SV description

Custom-made R and Perl scripts were used to edit other tools outputs, describe ONT and Bionano SVs (types, size), locate SVs along the chromosomes and filter them. For ONT technology, SVs identified as assemblies'discordances were quickly described and discarded before comparison. Those included sequences (SEQ), breaks (BRK) and jumps (JMP) ONT SV because they correspond to assembly or reference artifacts. Finally, size filters (more than 1 kb) were applied to take into account ONT high sequencing error rate, and low quality Bionano SVs. For Bionano SVs the largest absolute positions of the SV were conserved, taking into account the uncertainty around breakpoints due to the distance between two labels.

SV comparison

The ONT and Bionano SV medians sizes comparison was dealed with the ggpubr R package (http://www.sthda.com/english/wiki/unpaired-two-samples-wilcoxon-test-in-r). The boxplots were drawn with *ggboxplot* tool (my_data, x = "Technology", y = "size", fill = "Technology", palette = c("darkgoldenrod1", "darkorchid"), notch = TRUE, ylab = "Size in base (log10)", xlab = FALSE, ylim = c(0,7), add = "median", add.params = list (size = 0.5,color = "red")) and the Wilcoxon statistical test (H0 = median of ONT SV size is less than Bionano one) performed with *stat_compare_means* tool (method = "wilcox.test", methods.args = list (alternative = "less"), label.y = 6). The test is considered

UNCORRECTED PROOF

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

as statistical when the p-value is less than the selected threshold. We chose here the standard one of 5%.

Comparison of SV obtained with both ONT and Bionano technologies were based on the overlap of their absolute positions.

ONT SV and Bionano SVs files were used after conversion to BED format to identify overlapping regions with BEDtools (version 2.27.1, github commit cd82ed5, "bedtools intersect -wa -wb -a INPUT1.bed -b INPUT2.bed -loj > OUTPUT.bed"). Raw comparisons were then compared, compiled and formatted in one final output file using custom-made R scripts. For each SVs location, this file contained descriptors (SVs size, type, quality) for both technologies, information on the type of conflict and a 2 letter code. This code characterized the SVs location as follows: the first letter corresponds to the ONT SV characterization, the second to the Bionano SV. M ("Multiple") means more than one SV locations, U ("Unique") one SV location, N ("No") no SV location. For example, the code "MU" means that this location harbored multiple ONT SV corresponding to a unique Bionano location. No UM localization (corresponding to an ONT localization overlapping several Bionano SV localizations) was detected in our study. The landscapes and SVs occurrences visualization was performed with Circos/0.69.9 tool (perl/5.16.3 [70]).

SV and annotation

SVs overlapping a gene and/or TE were identified with the bedtools intersect by comparing their absolute positions to *A. thaliana* Col-0 annotations (July 11th 2019 release, TAIR10_GFF3_genes_transposons.gff). Lists of genes impacted by SV for both technologies were extracted and a GO-term enrichment analysis performed using Fisher's Exact test with a Bonferroni correction in PANTHER (released 20,200,407 with GO Ontology database DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.3873405 Released 2020-06-01, [62], http://go.pantherdb.org/). Significance was evaluated based on a *P*-value $\leq 10-5$ and an FDR value ≤ 0.01 [71].

Abbreviations

bp: Base pairs; BRK: Break; CGH: Comparative Genomic Hybridization; CNV: Copy number variations; Col-0: *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia-0; DEL: Deletion; DLE-1: Direct Label Enzyme – 1; DLS: Direct Label and Stain; DUP: Duplication; Hi-C: HIgh-throughput chromatin conformation Capture; Indels: Insertions/deletions; INS: Insertion; INV: Inversion; JMP: Jump; Kb: Kilobases; Ler-1: *Arabidopsis thaliana* ecotypes Landsberg *erecta* 1; NA: Not Available; NGS: Next Generation Sequence; ONT: Oxford Nanopore Technologies; PAV: Presence/absence variations; RA: Rapid Assembler; SDN: SMARTdenovo; SEQ: Sequence; SNP: Single Nucleotid Polymorphism; SV: Structural Variation; TAIR: TAIR10.1 last version of *Arabdopsis thaliana* Col-0 reference sequence genome available at the The Arabidopsis Information Resource repository; TE: Transposable Element; TRA: Translocation.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12864-022-08499-4.

Additional file 1.

Additional file 2.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Institute of Plant Sciences Paris Saclay (IPS2, https://ips2.u-psud.fr/fr/index.html) where the *Arabidopsis* cultures were carried out.
We also greatly thank Damien Hinsinger for advice on the manuscript, Alan of 1to1Progress and Janaina Rigonato for proofreading and the INRAE PepiAnnot Group (https://pepi-ibis.inra.fr/annotation-genomes) for helpful discussions.

Authors' contributions

The project was conceived by VB, MCLP and PFR. Plant cultures and the HMW DNA extraction for Oxford Nanopore and Bionano Technologies were carried out by ED and GM, data acquisition by ED, GM, CC, CB, BI and equipment provided by PW, MCLP, PFR, VB. Data analysis were performed by AC, BI and CB for assemblies, optical maps and SV detection and AC and RG for SV comparisons. PFR, VB contributed to data interpretation with AC and RG. The manuscript was written by AC, RG, PFR, VB with inputs from PW and MCLP. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation l'Environnement) and Genoscope-CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives).

Availability of data and materials

The ONT reads files and the Bionano molecules files have been submitted to the European Nucleotide Archive (http://www.ebi.ac.uk) and are publicly available with the accession numbers PRJEB44307 and ERZ1959921 respectively. Assemblies and optical maps of the Evry.Col-0 and Evry.Ler-1 genomes are publicly available in separated ENA studies with the accession number ERS6258851 and ERS6258852 respectively.
"Custom-made" scripts of this study are deposited in the INRAE repository https://forgemia.inra.fr/epgv/sv-arabido and publicly available..

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Plant seeds of ***A. thaliana*** Columbia and Landsberg ***erecta*** used in the experiments were provided by the Versailles ***Arabidopsis*** Stock Center (Versailles, France). All plant materials (not endangered materials or species) comply with local institutional guidelines and legislation.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

[1]Université Paris-Saclay, INRAE, Etude du Polymorphisme des Génomes Végétaux EPGV, 91000 Evry-Courcouronnes, France. [2]Genoscope, Institut de biologie François-Jacob, Commissariat à l'Energie Atomique CEA, Université Paris-Saclay, Evry, France. [3]Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 91057 Evry, France.

Received: 16 April 2021 Accepted: 17 March 2022

UNCORRECTED PROOF

Journal : BMCTwo 12864 | Dispatch : 12-4-2022 | Pages : 17
Article No : 8499 | ☐ LE | ☐ TYPESET
MS Code : | ☑ CP | ☑ DISK

References

1. Saxena RK, Edwards D, Varshney RK. Structural variations in plant genomes. Brief Funct Genom. 2014;13(4):296–307.
2. Escaramís G, Docampo E, Rabionet R. A decade of structural variants: description, history and methods to detect structural variation. Brief Funct Genomics. 2015;14(5):305–14.
3. Zhang X, Chen X, Liang P, Tang H. Cataloging plant genome structural variations. Curr Issues Mol Biol. 2018:181–94.
4. Ho SS, Urban AE, Mills RE. Structural variation in the sequencing era. Nat Rev Genet. 2020;21(3):171–89.
5. Wendel JF, Jackson SA, Meyers BC, Wing RA. Evolution of plant genome architecture. Genome Biol. 2016;17(1):1–14.
6. Gabur I, Chawla HS, Snowdon RJ, Parkin IAP. Connecting genome structural variation with complex traits in crop plants. Theor Appl Genet. 2019;132(3):733–50.
7. Schiessl S-V, Katche E, Ihien E, Chawla HS, Mason AS. The role of genomic structural variation in the genetic improvement of polyploid crops. Crop Journal. 2019;7(2):127–40.
8. Voichek Y, Weigel D. Identifying genetic variants underlying phenotypic variation in plants without complete genomes. Nat Genet. 2020;52(5):534–40.
9. Muñoz-Amatriaín M, Eichten SR, Wicker T, Richmond TA, Mascher M, Steuernagel B, et al. Distribution, functional impact, and origin mechanisms of copy number variation in the barley genome. Genome Biol. 2013;14(6):R58.
10. Dolatabadian A, Patel DA, Edwards D, Batley J. Copy number variation and disease resistance in plants. Theor Appl Genet. 2017;130(12):2479–90.
11. Fuentes RR, Chebotarov D, Duitama J, Smith S, De la Hoz JF, Mohiyuddin M, et al. Structural variants in 3000 rice genomes. Genome Res. 2019;29(5):870–80.
12. Tao Y, Zhao X, Mace E, Henry R, Jordan D. Exploring and exploiting Pan-genomics for crop improvement. Mol Plant. 2019;12(2):156–69.
13. Wei H, Liu J, Guo Q, Pan L, Chai S, Cheng Y, et al. Genomic organization and comparative phylogenic analysis of NBS-LRR resistance gene family in Solanum pimpinellifolium and Arabidopsis thaliana. Evol Bioinformatics Online. 2020;16:1176934320911055.
14. Prunier J, Caron S, MacKay J. CNVs into the wild: screening the genomes of conifer trees (Picea spp.) reveals fewer gene copy number variations in hybrids and links to adaptation. BMC Genomics. 2017;18(1):97.
15. Prunier J, Giguère I, Ryan N, Guy R, Soolanayakanahally R, Isabel N, et al. Gene copy number variations involved in balsam poplar (Populus balsamifera L.) adaptive variations. Mol Ecol. 2019;28(6):1476–90.
16. Wang Y, Xiong G, Hu J, Jiang L, Yu H, Xu J, et al. Copy number variation at the GL7 locus contributes to grain size diversity in rice. Nat Genet. 2015;47(8):944–8.
17. Gong C, Du Q, Xie J, Quan M, Chen B, Zhang D. Dissection of Insertion–Deletion Variants within Differentially Expressed Genes Involved in Wood Formation in Populus. Front Plant Sci [Internet]. 2018; [cited 2019 Aug 20];8. Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.02199/full?report=reader.
18. Gao L, Gonda I, Sun H, Ma Q, Bao K, Tieman DM, et al. The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. Nat Genet. 2019;51(6):1044.
19. Tranchant-Dubreuil C, Rouard M, Sabot F. Plant pangenome: impacts on phenotypes and evolution. Ann Plant Rev. 2019; May [cited 2021 Feb 11]; Available from: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02053647.
20. Khan AW, Garg V, Roorkiwal M, Golicz AA, Edwards D, Varshney RK. Super-Pangenome by integrating the wild side of a species for accelerated crop improvement. Trends Plant Sci. 2020;25(2):148–58.
21. Li R, Li Y, Zheng H, Luo R, Zhu H, Li Q, et al. Building the sequence map of the human pan-genome. Nat Biotechnol. 2010;28(1):57–63.
22. Sherman RM, Forman J, Antonescu V, Puiu D, Daya M, Rafaels N, et al. Assembly of a pan-genome from deep sequencing of 910 humans of African descent. Nat Genet. 2019;51(1):30–5.
23. Duan Z, Qiao Y, Lu J, Lu H, Zhang W, Yan F, et al. HUPAN: a pan-genome analysis pipeline for human genomes. Genome Biol. 2019;20(1):149.
24. Jiao W-B, Schneeberger K. Chromosome-level assemblies of multiple Arabidopsis genomes reveal hotspots of rearrangements with altered evolutionary dynamics. Nat Commun. 2020;11(1):989.
25. Song J-M, Guan Z, Hu J, Guo C, Yang Z, Wang S, et al. Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of Brassica napus. Nat Plants. 2020;6(1):34–45.
26. Springer NM, Ying K, Fu Y, Ji T, Yeh C-T, Jia Y, et al. Maize Inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation (PAV) in genome content. PLoS Genet. 2009;5(11):e1000734.
27. Swanson-Wagner RA, Eichten SR, Kumari S, Tiffin P, Stein JC, Ware D, et al. Pervasive gene content variation and copy number variation in maize and its undomesticated progenitor. Genome Res. 2010;20(12):1689–99.
28. Hwang JE, Kim S-H, Jung IJ, Han SM, Ahn J-W, Kwon S-J, et al. Comparative genomic hybridization analysis of rice dwarf mutants induced by gamma irradiation. Genet Mol Res. 2016;15(4).
29. Mabire C, Duarte J, Darracq A, Pirani A, Rimbert H, Madur D, et al. High throughput genotyping of structural variations in a complex plant genome using an original Affymetrix® axiom® array. BMC Genomics. 2019;20(1):848.
30. Redmond SN, Sharma A, Sharakhov I, Tu Z, Sharakhova M, Neafsey DE. Linked-read sequencing identifies abundant microinversions and introgression in the arboviral vector Aedes aegypti. BMC Biol. 2020;18(1):26.
31. Rhoads A, Au KF. PacBio sequencing and its applications. Genom Proteomics Bioinform. 2015;13(5):278–89.
32. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly. Genom Proteomics Bioinform. 2016;14(5):265–79.
33. Mahmoud M, Gobet N, Cruz-Dávalos DI, Mounier N, Dessimoz C, Sedlazeck FJ. Structural variant calling: the long and the short of it. Genome Biol. 2019;20(1):246.
34. Huddleston J, Chaisson MJP, Steinberg KM, Warren W, Hoekzema K, Gordon D, et al. Discovery and genotyping of structural variation from long-read haploid genome sequence data. Genome Res. 2017;27(5):677–85.
35. De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C, Berger B. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. Bioinformatics. 2018;34(15):2666–9.
36. Chaisson MJP, Sanders AD, Zhao X, Malhotra A, Porubsky D, Rausch T, et al. Multi-platform discovery of haplotype-resolved structural variation in human genomes. Nat Commun. 2019;10(1):1784.
37. Beyter D, Ingimundardottir H, Oddsson A, Eggertsson HP, Bjornsson E, Jonsson H, et al. Long-read sequencing of 3,622 Icelanders provides insight into the role of structural variants in human diseases and other traits. Nat Genet. 2021;10:1–8.
38. Zapata L, Ding J, Willing E-M, Hartwig B, Bezdan D, Jiao W-B, et al. Chromosome-level assembly of *Arabidopsis thaliana* L. *er* reveals the extent of translocation and inversion polymorphisms. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(28):E4052–60.
39. Michael TP, Jupe F, Bemm F, Motley ST, Sandoval JP, Lanz C, et al. High contiguity Arabidopsis thaliana genome assembly with a single nanopore flow cell. Nat Commun. 2018;9(1):541.
40. Jupe F, Rivkin AC, Michael TP, Zander M, Motley ST, Sandoval JP, et al. The complex architecture and epigenomic impact of plant T-DNA insertions. PLoS Genet [Internet]. 2019;15(1) Jan 18 [cited 2021 May 20]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6338467/.
41. Pucker B, Kleinbölting N, Weisshaar B. Large scale genomic rearrangements in selected *Arabidopsis thaliana* T-DNA lines are caused by T-DNA insertion mutagenesis [internet]. Plant Biol. 2021; Mar [cited 2021 Mar 8]. Available from: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.03.03.433755.
42. Belser C, Istace B, Denis E, Dubarry M, Baurens F-C, Falentin C, et al. Chromosome-scale assemblies of plant genomes using nanopore long reads and optical maps. Nature Plants. 2018;4(11):879–87.
43. Sun S, Zhou Y, Chen J, Shi J, Zhao H, Zhao H, et al. Extensive intraspecific gene order and gene structural variations between Mo17 and other maize genomes. Nat Genet. 2018;50(9):1289–95.
44. Dumschott K, Schmidt MH-W, Chawla HS, Snowdon R, Usadel B. Oxford Nanopore sequencing: new opportunities for plant genomics? Raines C, editor. J Exp Bot. 2020;71(18):5313–22.
45. Lam ET, Hastie A, Lin C, Ehrlich D, Das SK, Austin MD, et al. Genome mapping on nanochannel arrays for structural variation analysis and sequence assembly. Nat Biotechnol. 2012;30(8):771–6.
46. Cao H, Hastie AR, Cao D, Lam ET, Sun Y, Huang H, et al. Rapid detection of structural variation in a human genome using nanochannel-based genome mapping technology. GigaSci. 2014;3(1):34.

Journal : BMCTwo 12864	Dispatch : 12-4-2022	Pages : 17
Article No : 8499	☐ LE	☐ TYPESET
MS Code :	☑ CP	☑ DISK

CORRECTED PROOF

47. Levy-Sakin M, Pastor S, Mostovoy Y, Li L, Leung AKY, McCaffrey J, et al. Genome maps across 26 human populations reveal population-specific patterns of structural variation. Nat Commun. 2019;10(1):1025.
48. Leung AK-Y, Liu MC-J, Li L, Lai YY-Y, Chu C, Kwok P-Y, et al. OMMA enables population-scale analysis of complex genomic features and phylogenomic relationships from nanochannel-based optical maps. Gigascience. 2019;8(7) 1 [cited 2019 Sep 24]. Available from: https://academic.oup.com/gigascience/article/8/7/giz079/5530323.
49. Soto DC, Shew C, Mastoras M, Schmidt JM, Sahasrabudhe R, Kaya G, et al. Identification of structural variation in chimpanzees using optical mapping and Nanopore sequencing. Genes (Basel). 2020;11(3).
50. Yuan Y, Milec Z, Bayer PE, Vrána J, Doležel J, Edwards D, et al. Large-scale structural variation detection in subterranean clover subtypes using optical mapping. Front Plant Sci. 2018;17(9):971.
51. Maestri S, Gambino G, Minio A, Perrone I, Cosentino E, Giovannone B, et al. Genomic structural variation in 'Nebbiolo' grapevines at the individual, clonal and cultivar levels. bioRxiv. 2020;2020 10.27.357046.
52. Dixon JR, Xu J, Dileep V, Zhan Y, Song F, Le VT, et al. Integrative detection and analysis of structural variation in cancer genomes. Nat Genet. 2018;50(10):1388–98.
53. Long E, Evans C, Chaston J, Udall JA. Genomic structural variations within five continental populations of *Drosophila melanogaster*. G3 (Bethesda). 2018;8(10):3247–53.
54. Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k* -mer weighting and repeat separation. Genome Res. 2017;27(5):722–36.
55. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics. 2018;34(18):3094–100.
56. Sloan DB, Wu Z, Sharbrough J. Correction of persistent errors in Arabidopsis reference mitochondrial genomes. Plant Cell. 2018;30(3):525–7.
57. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. GigaScience. 2021;10:giab008. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008.
58. Vaser R. Rapid Assembler. 2018. https://github.com/lbcb-sci/ra.
59. Liu H, Wu S, Li A, Ruan J. SMARTdenovo: a de novo assembler using long noisy reads. Gigabyte. 2021. https://doi.org/10.46471/gigabyte.15.
60. Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, et al. Versatile and open software for comparing large genomes. Genome Biol. 2004;9.
61. Jain M, Tyson J, Loose M, Ip C, Eccles D, O'Grady J, et al. MinION analysis and reference consortium: phase 2 data release and analysis of R9.0 chemistry. F1000Research. 2017;31(6):760.
62. Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X, Thomas PD. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D419–26.
63. Goel M, Sun H, Jiao W-B, Schneeberger K. SyRI: finding genomic rearrangements and local sequence differences from whole-genome assemblies. Genome Biol. 2019;20(1):277.
64. Pucker B, Holtgräwe D, Stadermann KB, Frey K, Huettel B, Reinhardt R, et al. A chromosome-level sequence assembly reveals the structure of the Arabidopsis thaliana Nd-1 genome and its gene set. PLoS One. 2019;14(5):e0216233.
65. Stupar RM, Lilly JW, Town CD, et al. Complex mtDNA constitutes an approximate 620-kb insertion on Arabidopsis thaliana chromosome 2: implication of potential sequencing errors caused by large-unit repeats. PNAS. 2001;98(9):5099–103. https://doi.org/10.1073/pnas.091110398.
66. Initiative TAG. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature. 2000;408(6814):796–815.
67. Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. Plant Cell. 2003;15(4):809–34.
68. Song Y, Ling N, Ma J, Wang J, Zhu C, Raza W, et al. Grafting resulted in a distinct proteomic profile of watermelon root exudates relative to the un-grafted watermelon and the rootstock plant. J Plant Growth Regul. 2016;35(3):778–91.
69. Staal J, Kaliff M, Bohman S, Dixelius C. Transgressive segregation reveals two Arabidopsis TIR-NB-LRR resistance genes effective against Leptosphaeria maculans, causal agent of blackleg disease. Plant J. 2006;46(2):218–30.
70. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. Genome Res. 2009;19(9):1639–45.
71. Lin M, Fang J, Hu C, Qi X, Sun S, Chen J, et al. Genome-wide DNA polymorphisms in four Actinidia arguta genotypes based on whole-genome re-sequencing. PLoS One. 2020;15(4):e0219884.
72. Zmienko A, Marszalek-Zenczak M, Wojciechowski P, Samelak-Czajka A, Luczak M, Kozlowski P, et al. AthCNV: a map of DNA copy number variations in the Arabidopsis genome [OPEN]. Plant Cell. 2020;32(6):1797–819.
73. Toda N, Rustenholz C, Baud A, Le Paslier M-C, Amselem J, Merdinoglu D, et al. NLGenomeSweeper: A Tool for Genome-Wide NBS-LRR Resistance Gene Identification. Genes (Basel). 2020;11(3) 20 [cited 2021 Apr 12]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7141099/.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC

Journal : BMCTwo 12864	Dispatch : 12-4-2022	Pages : 17
Article No : 8499	☐ LE	☐ TYPESET
MS Code :	☑ CP	☑ DISK

CORRECTED PROOF

Annexe 5 :

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 18 November 2021
doi: 10.3389/fmicb.2021.734782

Bacterial Abundance, Diversity and Activity During Long-Term Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics in Seawater

*Charlene Odobel[1†], Claire Dussud[1†], Lena Philip[1,2], Gabrielle Derippe[3], Marion Lauters[1], Boris Eyheraguibel[4], Gaëtan Burgaud[5], Alexandra Ter Halle[6], Anne-Leila Meistertzheim[2], Stephane Bruzaud[3], Valerie Barbe[7] and Jean-Francois Ghiglione[1]**

[1] CNRS, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne (LOMIC), Sorbonne Université, Observatoire Océanologique de Banyuls, Banyuls-sur-Mer, France, [2] SAS Plastic@Sea, Observatoire Océanologique de Banyuls, Banyuls-sur-Mer, France, [3] CNRS, UMR 6027, Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRDL), Université de Bretagne-Sud, Lorient, France, [4] CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, [5] CNRS, EA 3882, Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM), Plouzané, France, [6] CNRS, UMR 5623, Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP), Université de Toulouse, Toulouse, France, [7] CEA, CNRS, Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France*

OPEN ACCESS

Edited by:
Fabrice Martin-Laurent, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), France

Reviewed by:
Vinod Kumar, Guru Ghasidas Vishwavidyalaya, India
Prosun Tribedi, The Naoria University, India

***Correspondence:**
Jean-Francois Ghiglione
ghiglione@obs-banyuls.fr
†These authors share first authorship

Specialty section:
This article was submitted to Microbiotechnology, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: *01 July 2021*
Accepted: *17 September 2021*
Published: *18 November 2021*

Citation:
Odobel C, Dussud C, Philip L, Derippe G, Lauters M, Eyheraguibel B, Burgaud G, Ter Halle A, Meistertzheim A-L, Bruzaud S, Barbe V and Ghiglione J-F (2021) Bacterial Abundance, Diversity and Activity During Long-Term Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics in Seawater. Front. Microbiol. 12:734782. doi: 10.3389/fmicb.2021.734782

The microorganisms living on plastics called "plastisphere" have been classically described as very abundant, highly diverse, and very specific when compared to the surrounding environments, but their potential ability to biodegrade various plastic types in natural conditions have been poorly investigated. Here, we follow the successive phases of biofilm development and maturation after long-term immersion in seawater (7 months) on conventional [fossil-based polyethylene (PE) and polystyrene (PS)] and biodegradable plastics [biobased polylactic acid (PLA) and polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV), or fossil-based polycaprolactone (PCL)], as well as on artificially aged or non-aged PE without or with prooxidant additives [oxobiodegradable (OXO)]. First, we confirmed that the classical primo-colonization and growth phases of the biofilms that occurred during the first 10 days of immersion in seawater were more or less independent of the plastic type. After only 1 month, we found congruent signs of biodegradation for some bio-based and also fossil-based materials. A continuous growth of the biofilm during the 7 months of observation (measured by epifluorescence microscopy and flow cytometry) was found on PHBV, PCL, and artificially aged OXO, together with a continuous increase in intracellular (^{3}H-leucine incorporation) and extracellular activities (lipase, aminopeptidase, and β-glucosidase) as well as subsequent changes in biofilm diversity that became specific to each polymer type (16S rRNA metabarcoding). No sign of biodegradation was visible for PE, PS, and PLA under our experimental conditions. We also provide a list of operational taxonomic units (OTUs) potentially involved in the biodegradation of these polymers under natural seawater conditions, such as *Pseudohongiella* sp. and *Marinobacter* sp. on PCL,

Marinicella litoralis and *Celeribacter* sp. on PHBV, or Myxococcales on artificially aged OXO. This study opens new routes for a deeper understanding of the polymers' biodegradability in seawaters, especially when considering an alternative to conventional fossil-based plastics.

Keywords: microbial ecotoxicology, plastisphere, biofouling, biofilm, plastic pollution

INTRODUCTION

The marine environment has become sinks for vast quantities of anthropogenic debris, including mismanaged plastic waste, estimated to 4.8–12.7 million metric tons entering the oceans every year (Jambeck et al., 2015). Microplastics (< 5 mm) represent more than 90% of the total counts of marine plastic debris, mostly originated from larger debris fragmentation by a combination of physical, chemical, and biological processes (Eriksen et al., 2014). Microplastics are generally composed of polyethylene (PE), polypropylene (PP), and polystyrene (PS), three conventional polyolefins highly refractory to biodegradation because of their intrinsic features (Poulain et al., 2019). Issues related to marine plastic pollution are multifaceted and cross-sectoral, leading to numerous environmental, economic, and social impacts and thus calling for non-trivial legislative and non-legislative strategies, with some that have already been reported worldwide (Schnurr et al., 2018). Within the frame of transition to blue economy, a wide range of biodegradable plastics were developed as potential substitutes to conventional plastics (Science Advice for Policy by European Academies, 2020). Some are still petroleum-based, such as polycaprolactone (PCL) or oxobiodegradable plastics (OXO) made of PE with prooxidant additives stimulating abiotic oxidation processes needed for its biodegradation (Yashchuk et al., 2012; Eyheraguibel et al., 2017). Others are made from renewable resources including biological materials or agricultural resources (so called "bio-based"), such as polylactic acid (PLA) and polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate [PHBV, a commercially available polyhydroxyalkanoate (PHA)] (RameshKumar et al., 2020).

In the marine environment, the very diverse microbial communities living on any kind of plastic debris has been called "plastisphere" (Zettler et al., 2013). Microplastics offer a new habitat characterized by higher abundance and distinct communities as compared to the surrounding free-living or organic particle-attached bacteria (Dussud et al., 2018a). The colonization of new plastics released at sea until the formation of a mature biofilm has been described as a succession of several phases (Wright et al., 2020). During the first hours in marine waters, a "conditioning film" made of inorganic and organic matter supports the initial colonization phase generally initiated by Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria regardless of the polymer type and representing microorganisms with efficient surface adhesion (Oberbeckmann et al., 2015; Dussud et al., 2018b). A second phase consists of the biofilm growth involving a succession of rapidly growing bacteria such as Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, and Planctomycetes (Salta et al., 2013). The last phase that generally appears after 15 to 30 days in seawater relates to a mature biofilm and remains stable for several months (Kirstein et al., 2018). The description of these colonization phases has been done on several conventional plastic types, including on PE-based plastic bags (Lobelle and Cunliffe, 2011; Harrison et al., 2014), polyethylene terephthalate (PET)-based plastic bottles (Oberbeckmann et al., 2014), polyvinyl chloride (PVC) (Dang et al., 2008), PS coupons (Briand et al., 2012), and in comparisons between PE, PP, PET, and polycarbonate (PC) materials (Webb et al., 2009; De Tender et al., 2017). Fewer studies have compared conventional to biodegradable plastics (including PLA, PHBV, and OXO) in terms of community composition and dynamics (Eich et al., 2015; Dussud et al., 2018a; Cheng et al., 2021), with different experimental conditions and microbial parameters that made more challenging comparison between these studies.

In this study, we describe the colonization dynamics of microplastics made of conventional (PE and PS) and biodegradable polymers (PCL, PLA, and PHBV) in seawater. We also tested the initial formulation of OXO that is recalcitrant to biodegradation and different artificially aged OXO (AA-OXO) that can be further biodegraded by oxidative mechanisms in the environment. We hypothesized that mature biofilms from biodegradable plastics differed from conventional materials, both in terms of abundance, diversity, and activities. Such differences should permit the description of potentially biodegrading plastisphere members, which may differ according to the plastic type. We present here an original and comprehensive comparison of the bacterial colonization potential on six plastic formulations incubated in seawater by coupling heterotrophic production and ectoenzyme measurements, in parallel to bacterial abundance (epifluorescence microscopy and flow cytometry) and bacterial diversity (16S rRNA metabarcoding) during a long-term colonization in seawater (7 months).

MATERIALS AND METHODS

Plastic Manufacturing Process

The first four polymer films were commercially available, made of low-density PE (Borealis, ref. FA6224, Austria), PS (Goodfellow, ref. 065-289-66, United States), PCL (CAPA 6800, Perstorp Company, Sweden), and PLA (Goodfellow, ref. 247-628-87, United States). The fifth film was formed from dried PHBV pellets (supplied by Tianan Biological Materials Co. Ltd., under the trade name ENMAT Y1000P, China) by using compression molded in a CarverR hydraulic press at 180°C under a pressure of 10 metric tons for 3 min. The sixth film was made of OXO with the same low-density PE as described above, but additivated with

D_2W formulation based on manganese and iron and extruded at 180°C using a laboratory scale Rondol linear 18 mm blown film (provided by Symphony Environmental Ltd., United Kingdom).

We also used two artificially aged OXO (AA-OXO) made of the same OXO as described above but differing by the exposure time to UV (according to ASTM D5208: UVA 340, 0.78 W m^{-3} nm^{-1}) during 48 h for AA_{48}OXO and during 144 h for AA_{144}OXO. In both cases, UV aging was followed by a thermal aging during 96 h at 70°C (ASTM D5510) to increase the oxidation level. The same protocol was used for artificially aging of PE film by UV exposure for 144 h followed by a thermal aging during 96 h at 70°C, called AA_{144}PE film hereafter. Artificial aging was stopped when reaching carbonyl index of 1x/100 for AA_{48}OXO and 3x/100 for AA_{144}OXO, where x was the film thickness. Carbonyl index values were determined as the ratio of the peak intensity at 1,715 cm^{-1} to the peak intensity at 1,460 cm^{-1} (Selke et al., 2015) by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis (Spectrum 100 equipped with an ATR attenuated total reflectance, Perkin-Elmer). The level of 1x/100 was previously demonstrated as a prerequisite for biodegradability of OXO, according to the French agreement Association Française de NORmalization (AFNOR AC t51-808, 2012). No sign of oxidation was observed for the AA_{144}PE film by FTIR, which served as a control in our experiment.

The film's thicknesses were 200 µm for PS, PHBV, PCL, and PLA and 100 µm for PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, and AA_{144}OXO. Each of the nine films was cut into 100 circular pieces of 9 mm diameter with a puncher machine. Polymer pieces were sterilized with 70% ethanol and rinsed three times with sterile seawater (SSW) before incubation in natural seawater.

Incubation Under Natural Seawater Conditions During 7 Months

Each material type was incubated in aquariums with direct circulation to the sea, as previously described (Dussud et al., 2018a). Briefly, we used 10 identical aquariums consisting of trays of 1.8 L capacity (Sodispan, Spain) continually renewed with 20 µm pre-filtered seawater (Leroy Merlin, France) by individual water delivery valves and overflow ports setting a flow rate of 0.1 L min^{-1}. Seawater was pumped at 30 m from the coast and 4 m depth in the Banyuls bay, close to the SOLA observatory station (NW Mediterranean Sea, France). During the experiment, seawater temperature in the aquariums and in the Banyuls bay was between 12.5 and 19.5°C and salinity remained stable at 38.5. Incubations in aquariums were processed in the dark to avoid UV-related degradation of the polymers and algal development. One aquarium was used as control and contained only circulating seawater. The nine other aquariums contained the pieces of each film (PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, AA_{144}OXO, PS, PHBV, PCL, and PLA). Plastic pieces of each material type were sampled after 3, 10, 31, 74, 116, and 206 days, together with seawater from the control aquarium.

Epifluorescence Microscopy

One piece of each polymer was rinsed at each sampling time with sterilized seawater and fixed for 1 h at 4°C with 1% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) before freezing. Epifluorescence microscopy observations were done using an Olympus AX70 PROVIS after 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining according to Porter and Feig (1980). Pictures were taken on 10 fields of each polymer type and cell counting was done with the software Microbe Counter.

Flow Cytometry

Three pieces of each polymer were rinsed at each sampling time with sterile seawater before cell detachment, as previously described (Dussud et al., 2018b). Briefly, cell detachment pre-treatment was performed using 1 mM pyrophosphate (30 min at room temperature in the dark) followed by a sonication step (3 × 5 s, 40 kHz, 30% amplitude, sterilized probe Branson SLPe). Cells were fixed for 1 h at 4°C with 1% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) before freezing. In parallel, 3 × 1 ml of seawater from the control aquarium were also fixed using the same procedure. A 500 µl subsample was mixed with the nucleic acid dye SYBR Green I (final concentration 0.05% v/v, Sigma Aldrich) at room temperature for 15 min in the dark. Cell counts were performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA) equipped with a blue laser (488 nm, air-cooled, 20 mW solid state), as previously described (Mével et al., 2008). Cell counts were expressed as number of cells mm^{-2} for polymers and as number of cells ml^{-1} for seawater.

Heterotrophic Bacterial Production

Bacterial production (BP) was measured for each polymer type and at each sampling time by ^{3}H-leucine incorporation into proteins, as previously described (Dussud et al., 2018b). Briefly, ^{3}H-leucine (specific activity 112 Ci $mmol^{-1}$, Perkin Elmer) was added at 1 nM final concentration (completed with cold leucine to 150 nM) for polymer samples and 4.3 nM (completed with cold leucine to 42.8 nM) for 3 µm filtered seawater from the control aquarium. Triplicate samples were incubated in the dark at *in situ* temperature for 3 h. The polymers were rinsed with 5% TCA and 70% ethanol and then resuspended in 1.0 ml of a liquid scintillation cocktail (Ultima Gold). Radioactivity was determined in a Beckman Scintillation Counter (LS 5000CE) and data analyzed with the Microwin 2000 software. We used the empirical conversion factor of 1.55 ng C $pmol^{-1}$ of incorporated leucine to calculate BP (Simon and Azam, 1989). Values were given in ng C mm^{-2} h^{-1} for plastics and in ng C ml^{-1} h^{-1} for seawater.

Extracellular Enzymatic Activities

Three extracellular enzymatic activities were analyzed for amino peptidase, β-glucosidase, and lipase. Triplicates of 1/4 of plastic piece of each material type were placed in a 96-well plate with fluorogenic model substrates that were L-leucine-7amido-4-methyl coumarin (Leu-MCA, 10 mM final, Sigma Aldrich) for amino peptidase, 4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside at 20 mM for β-glucosidase (MUF-β-Glc, 20 mM final, Sigma Aldrich), and 4-methylumbelliferyl-oleate for lipase (MUF-Oleate, 20 mM final, Sigma Aldrich). These saturated concentrations for amino peptidase, β-glucosidase and lipase and optimized time incubations were determined prior to the extracellular enzymatic

activity measurement (data not shown). After 4 h (for seawater) or 8 h (for plastics) of incubation, 50 µl of a stop solution (SDS 10%) was added in all wells. Fluorescence was quantified using VICTOR3 spectrofluorometer (PerkinElmer) at a 380 nm wavelength for MCA and 364 nm for MUF substrates. A control was done in triplicate for each activity and each plastic type by adding the stop solution at the beginning of incubation. The spectrofluorometer was calibrated with MCA and MUF standard solutions diluted in sterile seawater. Values were given in nmol mm^{-2} h^{-1} for polymers and in nmol ml^{-1} h^{-1} for seawater.

DNA Extraction, PCR Amplification, and Sequencing

Plastic pieces were sampled for all plastic types and at each sampling time with sterilized forceps and stored at −80°C until analysis. In parallel, 1 L seawater was sampled on the same day in the control aquarium, successively filtered onto 3-µm and 0.2-µm pore size polycarbonate filters (47 mm diameter, Nucleopore), and filters were stored at −80°C until analysis. DNA extraction was performed on polymers or seawater at all sampling time, using a classical phenol-chloroform method for seawater samples, modified for the plastic samples as previously described (Dussud et al., 2018b). Briefly, the modification consisted in a sonication pretreatment (3 × 5 s with 30% amplitude, sterilized probe Branson SLPe) in order to increase the detachment of biofilm forming bacteria. The molecular size and purity of the DNA extracts were analyzed by agarose gel electrophoresis (1%) and the DNA was quantified by spectrophotometry (GeneQuant II, Pharmacia Biotech). Primers for Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of the 16S V3–V5 region were 515F-Y and 926R, well-suited for marine samples according to Parada et al. (2016) with Illumina-specific primers and barcodes. Sequencing was performed on Illumina MiSeq by Genoscope (Evry, France). Raw FASTA files were deposited at EBI under the accession number PRJEB37662. Sequence analysis was conducted using the FROGs pipeline (Escudié et al., 2017) supported on the Galaxy instance of Toulouse Midi-Pyrenees bioinformatics platform. The pre-process tool was used to merge the paired-ends raw reads using Flash (Magoè and Salzberg, 2011) and quality filtering and primers trimming with cutadapt (Martin, 2011). Sequence clustering was performed with the Swarm algorithm (Mahé et al., 2014). Chimeras were detected with the VSEARCH algorithm, by *de novo* UCHIME method (Edgar et al., 2011; Rognes et al., 2016) and were removed. Clusters were assigned with the Silva 128 16S rRNA database (Quast et al., 2012) and clusters that did not belong to Bacteria kingdom were removed as well as chloroplast and mitochondrial sequences. The clusters that had a reads number abundance lower than 0.005% of all reads were removed, according to Bokulich et al. (2013). The number of sequences per sample was normalized by rarefaction ($n = 17,865$). Finally, a table with 66 samples and 1,517 clusters was obtained.

Statistical Analysis

For each sample, we calculated Chao1 species richness estimator, Simpson and Shannon diversity indexes, and Pielou's evenness

TABLE 1 | OTUs richness (Observed) and diversity indexes (Chao1, Pielou, Shannon and Simpson) of free-living (F), organic particle-attached bacteria (A) and biofilms of different plastic types (PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, AA_{144}OXO, PS, PHBV, PCL, PLA) according to immersion time in seawater (3, 10, 31, 74, 116 and 206 days).

Sample type	Day	Observed	Chao1 ± se	Pielou	Shannon	Simpson
F	3	445	568 ± 27	0.67	4.11	0.95
	10	535	742 ± 40	0.66	4.16	0.94
	31	696	913 ± 40	0.67	4.40	0.95
	74	505	693 ± 38	0.65	4.07	0.94
	116	376	545 ± 40	0.62	3.69	0.91
	206	235	321 ± 27	0.53	2.92	0.89
A	3	810	946 ± 28	0.74	4.95	0.98
	10	905	1001 ± 21	0.80	5.47	0.98
	31	901	982 ± 19	0.86	5.86	0.99
	74	897	979 ± 19	0.80	5.46	0.99
	116	793	872 ± 19	0.81	5.40	0.99
	206	453	677 ± 51	0.68	4.13	0.96
PE	3	226	336 ± 31	0.51	2.78	0.90
	10	404	532 ± 31	0.58	3.48	0.90
	31	938	1041 ± 23	0.82	5.63	0.99
	74	738	879 ± 27	0.63	4.18	0.93
	116	412	486 ± 20	0.54	3.23	0.88
	206	777	871 ± 21	0.78	5.20	0.99
AA_{144}PE	3	286	375 ± 25	0.56	3.16	0.91
	10	433	561 ± 32	0.66	4.01	0.95
	31	882	1000 ± 24	0.80	5.44	0.99
	74	592	681 ± 22	0.72	4.57	0.96
	116	599	654 ± 15	0.75	4.83	0.98
	206	716	854 ± 30	0.75	4.96	0.98
OXO	3	240	344 ± 30	0.54	2.96	0.89
	10	479	607 ± 28	0.71	4.40	0.98
	31	702	909 ± 37	0.64	4.22	0.96
	74	611	691 ± 21	0.72	4.64	0.97
	116	559	599 ± 12	0.77	4.88	0.98
	206	569	729 ± 32	0.57	3.60	0.91
AA_{48}OXO	3	182	225 ± 16	0.51	2.66	0.86
	10	375	485 ± 26	0.62	3.70	0.94
	31	420	530 ± 26	0.52	3.12	0.85
	74	501	601 ± 25	0.70	4.36	0.96
	116	528	609 ± 21	0.72	4.50	0.97
	206	639	777 ± 29	0.72	4.65	0.97
AA_{144}OXO	3	183	254 ± 26	0.50	2.61	0.82
	10	519	665 ± 30	0.59	3.70	0.94
	31	812	935 ± 25	0.74	4.94	0.97
	74	519	654 ± 31	0.71	4.42	0.96
	116	486	573 ± 22	0.68	4.23	0.95
	206	352	557 ± 51	0.61	3.56	0.93
PS	3	503	682 ± 35	0.53	3.33	0.90
	10	488	647 ± 32	0.57	3.55	0.93
	31	666	791 ± 26	0.61	3.95	0.92
	74	674	868 ± 35	0.56	3.62	0.88
	116	825	902 ± 18	0.80	5.38	0.99
	206	830	939 ± 25	0.85	5.74	0.99
PHBV	3	260	332 ± 20	0.43	2.39	0.79
	10	388	541 ± 37	0.67	3.98	0.96

(Continued)

TABLE 1 | (Continued)

Sample type	Day	Observed	Chao1 ± se	Pielou	Shannon	Simpson
	31	317	471 ± 38	0.55	3.19	0.92
	74	609	835 ± 46	0.70	4.51	0.97
	116	535	667 ± 29	0.68	4.30	0.97
	206	343	430 ± 25	0.69	4.00	0.96
PCL	3	478	631 ± 31	0.51	3.12	0.89
	10	271	452 ± 47	0.54	3.04	0.91
	31	738	853 ± 23	0.64	4.24	0.94
	74	357	495 ± 32	0.58	3.44	0.92
	116	370	511 ± 34	0.53	3.12	0.87
	206	158	248 ± 29	0.33	1.67	0.67
PLA	3	223	327 ± 29	0.47	2.53	0.88
	10	665	815 ± 29	0.70	4.52	0.97
	31	739	884 ± 28	0.65	4.31	0.94
	74	793	887 ± 21	0.76	5.11	0.98
	116	840	944 ± 24	0.84	5.62	0.99
	206	785	908 ± 26	0.75	5.02	0.98

using the Phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013) of R software suite (**Table 1**). The non-parametric estimator of Chao1 was calculated as follows: $S = S_{obs} + a^2/2b * (N - 1)/N$, where S_{obs} is the number of OTUs observed in the sample, N is the number of sequences per sample, a is the number of OTUs detected only once, and b is the number of OTUs detected only twice (Chiu et al., 2014). Simpson diversity index was computed as $D = 1 - \Sigma[N_i*(N_i - 1)/N*(N - 1)]$, where N_i is the abundance of the i^{th} OTU in the sample (Simpson, 1949). Shannon index was calculated as $H = -\Sigma[p_i*\log(p_i)]$, where p_i is the proportion of the i^{th} OTU (Shannon and Weaver, 1949) and Pielou's evenness index was $R = H/\log_2 S_{obs}$ (Pielou, 1966). Differences with incubation time and between biodegradable and non-biodegradable plastics in richness and diversity indexes were tested using an ANOVA test (for normally distributed data, determined by a Shapiro test) or a Kruskal–Wallis test with R software.

Unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram based on Bray-Curtis dissimilarities was used for visualization of beta-diversity. A series of dissimilarity profile permutation tests (SIMPROF, PRIMER 6) was performed under a simple null hypothesis of no meaningful structure within a sub-cluster. Significant branches (SIMPROF, $p < 0.05$, in black in **Figure 4**) were used to define sample clusters. One-way analysis of similarity was performed on the same distance matrix (ANOSIM, PRIMER 6) to test the significant difference and to partition the variance of the beta-diversity matrix between days of incubation and between polymer types and seawater. Similarity Percentage analysis (SIMPER) was performed to identify the contribution of each operational taxonomic unit (OTU), using PRIMER 6. A first comparison between PE and AA_{144}PE revealed no specific species contribution of the plastisphere of one polymer to the other. The analyses then focused on the contributions of PE compared to other polymers (PHBV, PCL, OXO, AA_{48}OXO, AA_{144}OXO, AA_{144}PE, PS, and PLA) at final time (D206). A threshold at 50% was applied to identify the most relevant species. For each OTU identified, in order to improve the affiliation attributed by Silva 128 16S rRNA database, the sequence was blasted to the NCBI databases "16S ribosomal RNA from bacteria and archaea" and "nt." In some cases and depending on the identity percentage of the matches, a new affiliation has been proposed (**Table 2**). The data and graphical representations were performed using R statistical software version 3.5.0 (R Core Team, 2018).

RESULTS

Visual Changes of the Materials

After 3 days of immersion in seawater, we observed that the translucent PHBV fragment whitened and that AA_{144}OXO was very breakable, whereas the other plastic pieces showed no visual changes (**Figure 1**). The only change after 206 days in seawater was observed for PCL pieces, which showed a fivefold reduction in size compared to day 3.

Epifluorescence Microscopy and Flow Cytometry

Epifluorescence microscopy showed the successive steps of colonization and maturation of the biofilm during 206 days in seawater (**Figure 2**). No or very few cells were detected on plastics after their sterilization and before their immersion in seawater. The presence of a mature biofilm together with extracellular polymeric substances was visible in all plastic types at the end of the experiment, but biofilms presented higher thickness for PCL and AA_{144}OXO compared to the other plastics. Counting was not possible for PHBV because of autofluorescence background signal of the polymer.

It is noteworthy that no or very few cells were counted by flow cytometry after the sterilization of the plastic films and before their immersion in seawater, as found by epifluorescence microscopy. Flow cytometry confirmed the succession of phases during the colonization of the plastics (**Figure 3A**). The primo-colonization was characterized by a relatively high number of cell counts at day 3 (mean = 1.6×10^4, SD = 1.1×10^4 cells mm^{-2}, $n = 9$) that decreased at day 10 (mean = 4.6×10^3, SD = 1.1×10^3 cells mm^{-2}, $n = 9$), whatever the polymer type. Interestingly, a clear difference was found between PE and OXO (mean = 4.7×10^3, SD = 5.6×10^2 cells mm^{-2}, $n = 9$) and the same polymer but artificially aged (one order of magnitude higher for AA_{144}PE, AA_{48}OXO, and AA_{144}OXO).

A growing phase was found from day 10 to day 31 in all plastic films, followed by a stabilization phase of the biofilm that became mature and remains unchanged from day 31 to day 206 for PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, PS, and PLA. Exceptions were found for PCL, PHBV, and AA_{144}OXO that showed a continuous growth of biofilm until the end of the experiment (up to 2.0×10^4 cells mm^{-2} after 116 days for PHBV, PCL, and AA_{144}OXO). From 116 days in seawater, significant differences were found between cell counts on PHBV, PCL, and AA_{144}OXO compared to other plastics (*t*-test, *p*-value < 0.05). The cell detachment treatment was less efficient after 116 days for PHBV, PCL, and AA_{144}OXO, since we observed much lower

TABLE 2 | Taxonomy, relative abundance (r.a.) and contribution (cb) details (in %) of the 41 OTUs identified by SIMPER analysis, up to 30% of cumulative dissimilarity between PE and the other 6 plastics materials (AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, AA_{144}OXO, PS, PHBV, PCL, PLA) after 206 days of immersion in seawater.

	AA_{144}PE		OXO		AA_{48}OXO		AA_{144}OXO		PS		PHBV		PCL		PLA	
OTU taxonomy	**r.a.**	**cb**	**r.a.**	**cb**	**r.a.**	**cb**	**r.a.**	**cb**	**r.a.**	**cb**	**r.a.**	**cb**	**r.a.**	**cb**	**r.a.**	**cb**
Marinicella litoralis	0	0	0	0	0	0	0	0	0.017	0	5.9	3.2	0	0	0	0
Oceanospirillales	3.0	1.6	0.17	0	0.10	0	0.034	0	0.18	0	0	0	0	0	0.37	0
Oceanospirillales	4.5	3.5	0.20	0	0.067	0	0.017	0	0.19	0	0	0	0	0	0.25	0
Pseudohongiella sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52	26	0.011	0
Polycyclovorans sp.	7.9	3.4	4.7	0	7.6	0	0.022	0	0.43	0	0	0	0.062	0	5.7	0
Thioprofundaceae	0.44	0	0.12	0	0.067	0	0.43	0	2.5	1.8	0.12	0	0	0	0.68	0
Chromatiaceae	0.011	0	0.0056	0	0	0	0	0	0.034	0	0	0	0.056	0	3.7	2.8
Chromatiales	1.3	0	0.13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spongibacter sp.	0.23	0	0.22	0	0.52	0	0.011	0	0.062	0	0	0	0.073	0	4.5	0
Cellvibrionaceae	0	0	0	0	0.090	0	12	6.8	0.0056	0	0	0	1.2	0	0.15	0
Arenicellaceae	0.011	0	0	0	0.056	0	0.63	0	0.0056	0	0	0	0	0	0.017	0
Arenicellaceae	3.9	2.6	0.85	0	1.3	0	1.3	0	1.5	0	0.045	0	0	0	0.20	0
Pseudoalteromonas sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	2.2	0	0	0	0	0	0
Marinobacter sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	9.4	0.44	0
Gammaproteobacteria	1.8	1.3	14	9.9	5.0	2.8	0.017	0	0.15	0	0	0	0	0	0.76	0
Gammaproteobacteria	0.13	0	0.050	0	0.028	0	8.0	4.5	0.77	0	2.8	0	0	0	0.34	0
Gammaproteobacteria	3.0	3.4	1.9	0	0.062	0	0.12	0	0.42	0	0	0	0	0	0.017	0
Gammaproteobacteria	0	0	0	0	0	0	0.0056	0	0	0	9.7	5.2	0.0056	0	0	0
Gammaproteobacteria	0.36	0	0.084	0	0.10	0	0.0056	0	2.3	1.8	0	0	0	0	0.24	0
Myxococcales	0	0	0	0	0.16	0	10	5.7	0.011	0	0	0	0	0	0	0
Desulfovibrio sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.1	2.5
Nitrospira sp.	0.57	0	0.17	0	0.022	0	0.028	0	1.9	1.4	0	0	0	0	0.63	0
Colwellia sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.4	1.8	0	0	0	0
Marivita sp.	0	0	15	11	3.4	2.6	0.017	0	0.039	0	0	0	0	0	0.011	0
Rhodobacteraceae	0.31	0	0.050	0	0.88	0	0.0056	0	0.073	0	0	0	0	0	0.16	0
Rhodobacteraceae	0.050	0	0.045	0	0.27	0	0.039	0	0.10	0	8.9	4.8	0.38	0	1.4	0
Rhodobacteraceae	0.034	0	0.011	0	0.0056	0	0.028	0	0.11	0	4.4	2.3	0	0	0.13	0
Hyphomonadaceae	1.1	0	0.11	0	0.16	0	0	0	0.078	0	0	0	0	0	4.8	3.3
Hyphomonadaceae	0	0	0.011	0	3.2	2.4	0.0056	0	0.011	0	0.0056	0	0	0	0.0056	0
Rhodobacterales	0.017	0	20	15	6.3	4.7	0.0056	0	0.034	0	0	0	0	0	0.022	0
Rhizobiales	0	0	0	0	7.5	5.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0.039	0
Sakaromonadales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.7	3.8
Clostridiales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.8	3.9
Saprospirales	5.1	3.0	1.8	0	0.39	0	0.0056	0	1.1	0	0.022	0	0	0	0.20	0
Saprospirales	2.7	0	0.20	0	0.078	0	0	0	0.57	0	0	0	0	0	0.050	0
Saprospirales	1.2	0	0.49	0	0.034	0	0	0	0.16	0	0.0056	0	0	0	0.0056	0
Flavobacteriaceae	0.15	0	0.13	0	1.7	0	17	9.8	0.067	0	1.7	0	0	0	0.028	0
Flavobacteriaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.2	4.4	0.0056	0	0.0056	0
Cryomorphaceae	0.19	0	0.073	0	0.050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.8	3.7
Acidobacteria	3.2	0	0.82	0	0.45	0	0.045	0	0.70	0	0.11	0	0	0	0.034	0
Flavobacteriaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	8.0	0.0056	0

cell counts by flow cytometry while epifluorescence microscopy confirmed the presence of abundant biofilms after 206 days. Control seawater cell counts remained stable during the entire experiment (mean = $2.3 \pm 1.4 \times 10^5$ cells ml^{-1}).

Bacterial Activities

Bacterial Heterotrophic Production

A clear distinction between biodegradable and non-biodegradable plastics was observed by cell incorporation of radiolabeled ^{3}H-leucine (**Figure 3B**). The primo-colonizers on PE, AA_{144}PE, OXO, PS, and PLA showed high heterotrophic activities during the first 3 days of immersion (between 3.94×10^{-2} ng C mm^{-2} h^{-1} and 1.01×10^{-1} ng C mm^{-2} h^{-1}) followed by a dramatic and continuous decrease until the end of the experiment (between 3.87×10^{-3} and 1.77×10^{-2} ng C mm^{-2} h^{-1} at day 206). AA_{48}OXO exhibited the same dynamics with a slight delay in time, with high activities until day 10, followed by a sharp decrease. The three other

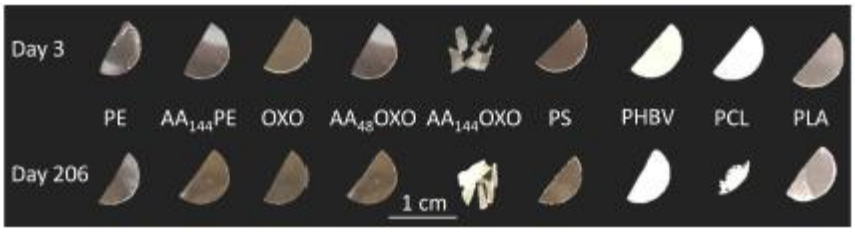


FIGURE 1 | Plastic pieces of different composition (PE, OXO, PS, PHBV, PCL, and PLA) at the beginning (3 days) and at the end (206 days) of the experimental immersion in seawater. A pretreatment by artificial aging was applied for PE and OXO films by UV-A exposure during 48 h (AA_{48}) or 144 h (AA_{144}) followed by a thermal aging during 96 h at 70°C.

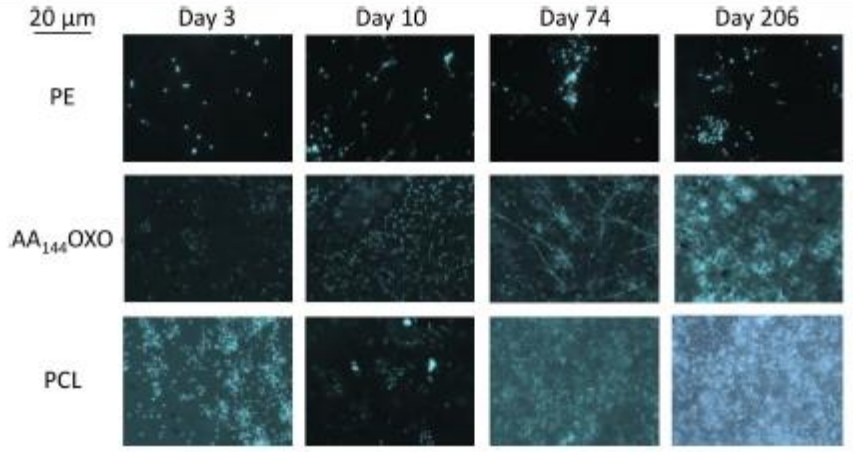


FIGURE 2 | Epifluorescence micrographs of a selection of DAPI-stained plastics (PE, AA_{144}OXO, and PCL) showing the formation and evolution of the biofilms of after 3, 10, 74, and 206 days of immersion in seawater. Artificial aging (AA) pretreatment applied for OXO polymers consisted in UV-A exposure during 144 h (AA_{144}) followed by a thermal aging during 96 h at 70°C.

materials (PCL, PHBV, and AA_{144}OXO) also presented high heterotrophic activities at the primo-colonization phase (day 3), but differed from the other plastics since their activities remained high and relatively stable until the end of the 206 days of seawater immersion. Maximum activities were found for PCL (2.45×10^{-1} ng C mm^{-2} h^{-1}), followed by PHBV (1.34×10^{-1} ng C mm^{-2} h^{-1}) and AA_{144}OXO (8.69×10^{-2} ng C mm^{-2} h^{-1}). Bacterial heterotrophic production remained stable during the entire experiment in control seawater (mean = 67.6 ± 42.2 ng C L^{-1} h^{-1}).

Extracellular Enzymatic Activities

Similar trends were found when observing the extracellular aminopeptidase, β-glucosidase, and lipase activities (**Figures 3C–E**, respectively). The general trend found for bacterial heterotrophic production (see *Section 3.3.1*) of a high activity of the primo-colonizers (day 3; mean = $9.5 \times 10^{-5} \pm 3.3 \times 10^{-5}$ µmol mm^{-2} h^{-1}, mean = $7.1 \times 10^{-7} \pm 8.8 \times 10^{-7}$ µmol mm^{-2} h^{-1}, and mean = $3.8 \times 10^{-5} \pm 1.8 \times 10^{-5}$ µmol mm^{-2} h^{-1} for aminopeptidase, β-glucosidase, and lipase, respectively) followed by a drastic decrease and further stabilization until the end of the experiment (206 days) was also found for extracellular activities. It was particularly true for lipase activities on PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, PS, and PLA biofilms. Aminopeptidase activities (mean = $3.75 \times 10^{-4} \pm 8.95 \times 10^{-5}$ µmol mm^{-2} h^{-1} with $n = 30$ for all plastics) and β-glucosidase (mean = $1.49 \times 10^{-5} \pm 4.49 \times 10^{-6}$ µmol mm^{-2} h^{-1} with $n = 30$ for all plastics) remained low for these plastics during the entire experiment. Again, PCL, PHBV, and AA_{144}OXO showed different trends when compared to other plastics. The highest extracellular activities were found when the biofilms became mature (after 31 days), with higher activities always found on PCL ($3.0 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-3}$ µmol

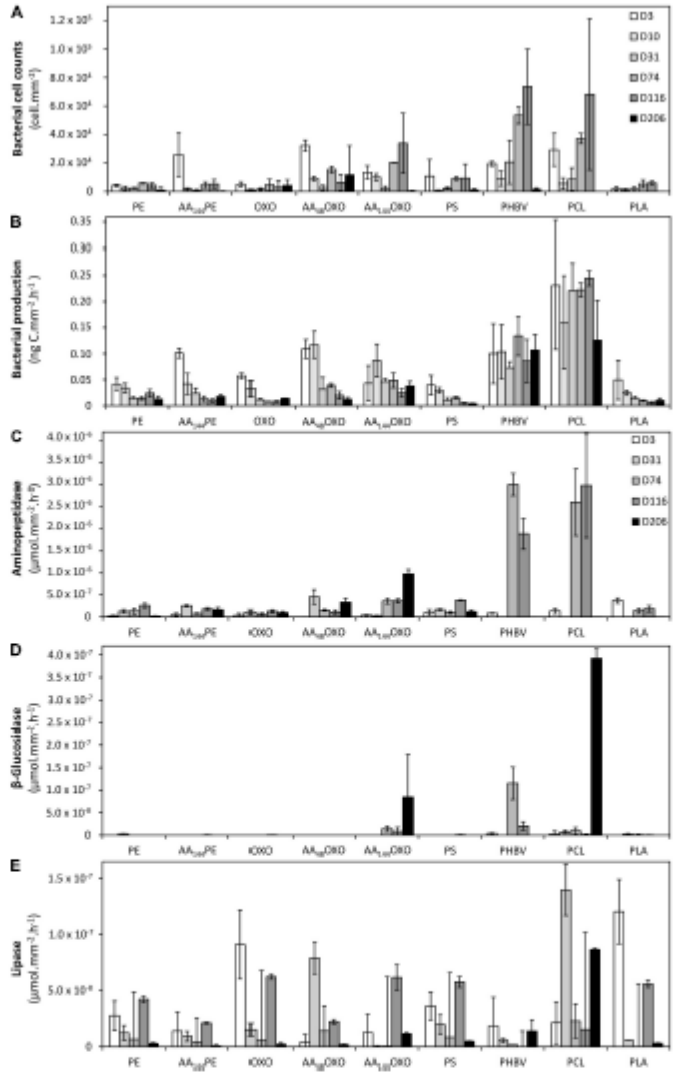


FIGURE 3 | Bacterial cell counts **(A)**, bacterial heterotrophic production **(B)**, and bacterial extracellular aminopeptidase **(C)**, β-glucosidase **(D)**, and lipase activities **(E)** on the different plastic types (PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, AA_{144}OXO, PS, PHBV, PCL, and PLA) immersed in seawater for 3, 10, 31, 74, 116, and 206 days. No data available on day 10 for extracellular activities. Error bars indicate standard deviation.

mm^{-2} h^{-1}, $3.9 \times 10^{-4} \pm 2.1 \times 10^{-5}$ µmol mm^{-2} h^{-1}, and $1.4 \times 10^{-4} \pm 2.3 \times 10^{-5}$ µmol mm^{-2} h^{-1} for aminopeptidase, β-glucosidase, and lipase, respectively) and PHBV ($3.0 \times 10^{-3} \pm 2.5 \times 10^{-4}$ µmol mm^{-2} h^{-1}, $1.1 \times 10^{-4} \pm 3.6 \times 10^{-5}$ µmol mm^{-2} h^{-1}, and $1.8 \times 10^{-5} \pm 2.6 \times 10^{-5}$ µmol mm^{-2} h^{-1} for aminopeptidase, β-glucosidase, and lipase, respectively), followed by AA_{144}OXO ($9.8 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-4}$ µmol mm^{-2} h^{-1}, $8.5 \times 10^{-5} \pm 9.5 \times 10^{-5}$ µmol mm^{-2} h^{-1}, and $6.2 \times 10^{-5} \pm 1.1 \times 10^{-5}$ µmol mm^{-2} h^{-1} for

aminopeptidase, β-glucosidase, and lipase, respectively). On the other hand, extracellular enzymatic activities remained stable during the entire experiment in control seawater ($1.1 \times 10^{-2} \pm 8.6 \times 10^{-3}$ µmol L^{-1} h^{-1}, $5.3 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-4}$ µmol L^{-1} h^{-1}, and $1.9 \times 10^{-3} \pm 3.5 \times 10^{-3}$ µmol L^{-1} h^{-1} for aminopeptidase, β-glucosidase, and lipase, respectively).

Dynamics of Bacterial Diversity

Alpha- and Beta-Diversity

Illumina Miseq DNA sequencing generated 9,054,841 paired sequences for the 66 samples, failing into 1517 OTUs after randomly resampling to 17,865 sequences per sample to provide statistical robustness when comparing diversity among samples.

The evolution of the Alpha-diversity was assessed with Chao1, Pielou, Shannon, and Simpson indexes (**Table 1**). Whatever plastic types, all indexes increased significantly between the primo-colonization (day 3) and the maturation phase of the biofilm (day 31) (pairwise *t*-test, $p < 0.05$). Chao1 species richness estimator almost doubled for all plastics between the primo-colonization and the maturation phase of the biofilm (mean = 390, SD = 135, $n = 9$ at day 3 and mean = 846, SD = 184, $n = 9$ at day 31) (**Table 1**). This index remained relatively stable until the end of the experiment for PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, PS, and PLA biofilms, while after day 74 and up to day 206, a decrease was observed on PCL, PHBV, and AA_{144}PE biodegradable polymers (mean = 753, SD = 147, $n = 3$ at day 31 and mean = 411, SD = 155, $n = 3$ at day 206). Shannon diversity index showed similar trends, with the exception of the decrease observed on the biodegradable polymers after day 74 and up to day 206, which was less on AA_{144}PE and PHBV compared to PCL (**Table 1**). Bacterial diversity found in seawater on both free-living and organic particle-attached fractions was much less influenced by the temporal dynamics, where all Alpha-diversity indexes remained relatively stable during the entire course of the experiment (Shannon mean = 3.9, SD = 0.5, $n = 6$ on free-living and mean = 5.2, SD = 0.6, $n = 6$ on organic particle-attached fractions).

Beta-diversity analysis showed strong dissimilarity (> 90%) between the free-living bacterial communities in seawater compared to plastic samples (**Figure 4**). Organic particle-attached bacterial communities in seawater also formed a separated cluster, with closer similarity with plastic samples, and especially with the non-biodegradable polymers (see below). Both free-living and organic particle-attached bacterial communities remained stable during the course of the experiment, which contrasted with the succession of distinct communities found on plastics. First, bacterial communities of all plastic materials clustered together during the primo-colonization phase (day 3), with little but significant changes observed on the biofilm growing phase (ANOSIM $R = 0.622$, $p = 0.001$ between day 3 and day 10). Second, we found a clear distinction between the mature biofilms (after 31 days) found on non-biodegradable (PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, PS, and PLA) compared to biodegradable polymers (PHBV, PCL, and AA_{144}OXO) (ANOSIM $R = 0.287$, $p = 0.001$). In particular, PCL and PHBV clusters strongly differed from the mature biofilms on other plastics, and AA_{144}OXO formed a distinct cluster together with AA_{48}OXO especially after 116 days of immersion in seawater.

Taxonomic Composition

Taxonomic analyses confirmed the specificity of the plastisphere compared to seawater free-living bacteria, the latter being dominated by Alphaproteobacteria (40%, mainly SAR11 clade with 24.8%), followed by Flavobacteriia (18.5%) and Gammaproteobacteria (28%, mainly Oceanospirillaceae with 7.9%) (**Figure 4**). Organic particle-attached bacterial communities were also dominated by Gammaproteobacteria (34.9%, mainly *Spongiibacter* sp. 4.3%), followed by Alphaproteobacteria (16%), Flavobacteriia (15%, mainly *Luteibaculum* sp. 5.3%), and Planctomycetacia (5.6%).

Whatever the plastic type, primo-colonizers (day 3) together with bacteria of the biofilm growing phases (day 10) belonged to Alteromonadales (mean = 21% SD = 11, $n = 18$), Oceanospirillales (mean = 17% SD = 14, $n = 18$, mainly represented by *Oleibacter* sp. and *Alcanivorax* sp.), and Cellvibrionales (mean = 10.1% SD = 9.4, $n = 18$, mainly represented by *Aestuariicella* sp.). Some exceptions were found for PCL (exhibiting higher proportions of *Oleiphilus* sp.), PLA (higher proportion of *Neptuniibacter* sp.), PS, and AA_{144}OXO (dominated by *Spongiibacter* sp.) (**Figure 4**).

The mature biofilms (after 31 days) differed between material types. The non-biodegradable materials (PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, and PS) together with PLA shared high proportions of Gammaproteobacteria (mean = 34 ± 11%), Alphaproteobacteria (mean = 24 ± 16%), Sphingobacteriia (mean = 8.8 ± 6.2%), and Flavobacteriia (mean = 5.0 ± 5.6%). Gammaproteobacteria class is composed of Cellvibrionales (mean = 13 ± 9%), with *Spongiibacter* sp. and *Zhongshania* sp. as main representatives as well as Xanthomonadales (mean = 5.6 ± 5.4%) with *Polycyclovorans* sp. PE and AA_{144}PE showed increasing proportions of Saprospiraceae (up to 23%), Planctomycetes (up to 14%, mainly OM190 clade and *Planctomyces* sp.), and Arenicellaceae (up to 7%, mainly *Arenicella* sp.) over time. The same tendency was observed for OXO and AA_{48}OXO with Rhodobacteraceae (up to 16%) and Flavobacteriaceae (up to 5%, mainly *Gilvibacter* sp.). Interestingly, AA_{48}OXO was distinguished by large proportions of Rhizobiales (OCS116 clade, up to 9.3%) and Hyphomonadaceae (mainly *Hirshia* sp., up to 36%). PS diversity profiles displayed higher proportions of Saprospiraceae (up to 19%, mainly *Lewinella* sp.) and Planctomycetaceae (up to 6.3%) at the end of the experiment. Likewise, PLA mature biofilm was composed of Planctomycetaceae (up to 12%, mainly *Planctomyces* sp. and *Rhodopirellula* sp.) and Flavobacteriales (up to 7%, mainly *Luteibaculum* sp.) with increasing proportions over the course of the experiment.

The diversity of mature biofilms was clearly distinct among PHBV, PCL, and AA_{144}OXO, with higher proportions of Alphaproteobacteria (mean = 36 ± 24%) compared to the non-biodegradable ones, followed by Gammaproteobacteria (mean = 29 ± 18%) and Flavobacteriia (mean = 11 ± 8.1%). PHBV is composed of Flavobacteriaceae (up to 26%, mainly

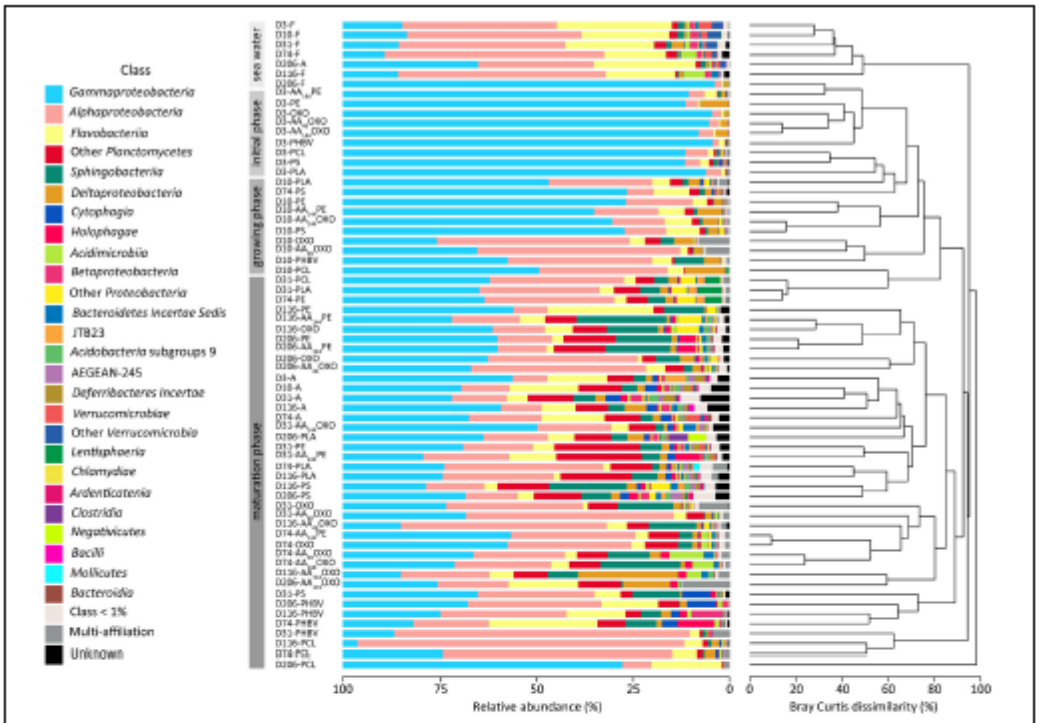


FIGURE 4 | Temporal variation of taxonomic abundances and community structure of free-living (F), organic particle-attached bacteria (A) and biofilms of different materials (PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, AA_{144}OXO, PS, PHBV, PCL, and PLA) immersed in seawater for 3, 10, 31, 74, 116, and 206 days (D), by cumulative bar charts comparing taxonomic relative abundances (left) and by UPGMA dendrogram based on Bray–Curtis dissimilarities between 16S rRNA-based sequencing profiles (right).

Maritimonas sp.), Cellvibrionaceae (up to 15%, mainly *Marinicella* sp.) and Rhizobiales (up to 12%, OCS116 clade), especially at the end of the incubation. PCL and AA_{144}OXO shared high proportions of Cellvibrionaceae (up to 23%) and Oceanospirillaceae (up to 52%, mainly *Pseudohongiella* sp.), but also specificities among Flavobacteriaceae, mainly *Aquibacter* sp. for PCL and *Gilvibacter* sp. for AA_{144}OXO. PCL also comprised Hyphomonadaceae (up to 40%, mainly *Hirshia* sp. and *Hyphomonas* sp.), whereas AA_{144}OXO showed noticeable proportions of Myxococcales (up to 23%, mainly Sandaracinacea family).

SIMPER analysis highlighted 40 dominant OTUs contributing to a cumulative 30% of the dissimilarity between PE, used as control, and the other polymers after 206 days in seawater (**Figure 5**). Among non-biodegradable polymers, comparison between PE and AA_{144}PE biofilms included six specific OTUs (Oceanospirillales, *Polycyclovorans* sp., Arenicallaceae, and Saprospirales). These OTUs shared low relative abundance and contribution, indicating a rather limited effect of artificial aging on PE. Limited specificities were also found on the other non-biodegradable materials when compared to PE control. AA_{48}OXO biofilm exhibited five contributive OTUs, including two exclusive (affiliated to Rhizobiales and Hyphomonadaceae) and three shared with OXO (affiliated to Rhodobacterales, *Marivita* sp., and Gammaproteobacteria). PLA exhibited six specific OTUs contributing between 3.6 and 3.9% (Clostridiales, Selenomonadales, Cryomorphaceae, Hyphomodadaceae, Chromatiaceae, and *Desulfuvibrio* sp.). Note that the most abundant taxon found on PLA (*Polycyclovorans* sp., 5.7% in relative abundance) was not found as PLA-specific taxa by SIMPER analysis. PS hosted four specific OTUs (Pseudoalteromonas, Thioprofundaceae, Gammaproteobacteria, and *Nitrospira* sp.) but with low relative abundance (1.9 to 2.5%) and low contribution to dissimilarity with the PE control (1.4 to 2.2%).

Interestingly, the most distinct taxa were found among the biodegradable polymers (PCL, PHBV, and AA_{144}OXO). PCL biofilm presented two highly abundant and contributive OTUs affiliated with *Pseudohongiella* sp. and *Marinobacter* sp. (52% and 19% in relative abundance, 26% and 9%

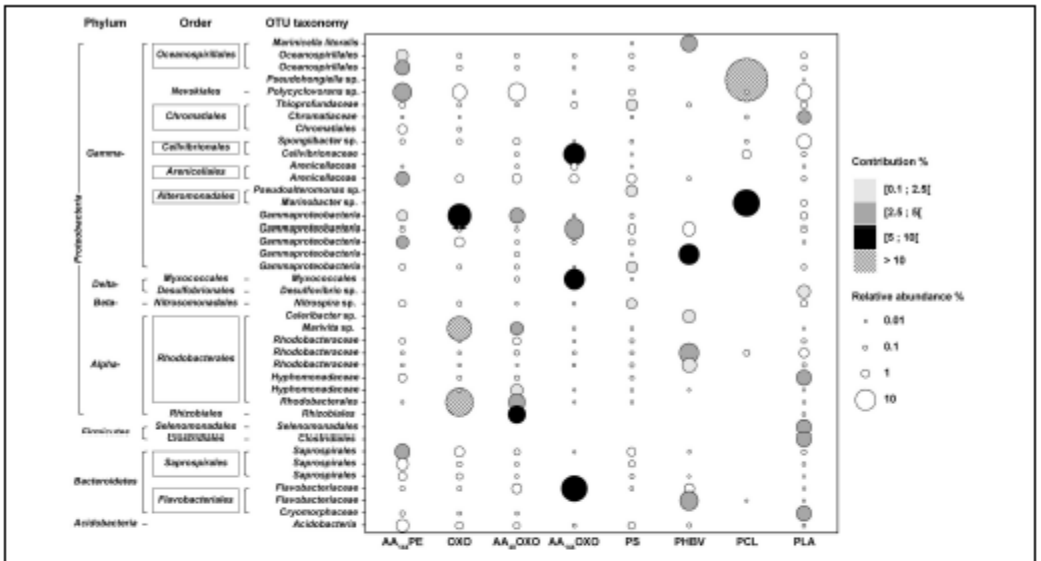


FIGURE 5 | Bubble plot showing the relative abundance and the taxonomy of the OTUs contributing to a cumulated 30% of the dissimilarity between PE and the eight other plastic materials (AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, AA_{144}OXO, PS, PHBV, PCL, and PLA) after 206 days of immersion in seawater (SIMPER analysis). Points are sized according to the relative abundance and colored by their contribution to dissimilarity.

contribution, respectively). A third PCL-specific OTU affiliated with Flavobacteriaceae was identified (8% contribution and 16% relative abundance). PHBV biofilm highlighted six specific OTUs with 1.8% to 5.2% of contribution, affiliated with Cellvibrionaceae, Bacteroidetes, Rhodobacteraceae, and Flavobacteraceae as well as *Marinicella litoralis* and *Celeribacter* sp. AA_{144}OXO biofilm exhibited four very abundant (from 8 to 17%) and contributive (from 4.5 to 9.8%) OTUs, affiliated with Flavobacteriaceae (also present on PHBV and AA_{48}OXO), Gammaproteobacteria, Cellvibrionaceae, and Myxococcales.

DISCUSSION

Successive Phases of Biofilm Formation on Plastics

Both epifluorescence microscopy and flow cytometry confirmed the succession of primo-colonization, growth, and maturation phases of the plastics biofilm, as it has been described earlier (see review by Jacquin et al., 2019). Most of the previous studies were based on experiments conducted over a several-week period, mainly on conventional polymer types generally found in the ocean (mostly PE, PET, PVC, and PS) and our study brings new data on microbial colonization of biodegradable plastics in seawater.

Our results showed a rapid bacterial colonization of more than 5×10^3 cells mm^{-2} on all material types, which is consistent with values found in studies focusing on the primo-colonization of plastic biofilms (Lee et al., 2008; Oberbeckmann et al., 2015). Interestingly, we found a significant difference in cell counts on PE or OXO after only 3 days of immersion in seawater as compared to same but artificially aged polymer(one order of magnitude higher for AA_{144}PE, AA_{48}OXO, and AA_{144}OXO). Such differences may be explained by the change in surface properties accompanying the artificial aging by UV and temperature (Attwood et al., 2006). Material properties (crystallinity and crystal structure, hydrophobicity, roughness, glass transition temperature, melting temperature, and modulus of elasticity) indeed play a crucial role in the selection of bacterial community in the early stage of colonization (Pompilio et al., 2008). We also observed significantly higher cell counts on PS, PHBV, and PCL as compared to PLA or PE during the primo-colonization phase, but complete characterization of surface properties was not done in this study.

The growth phase of the biofilms was characterized by cell count increase (visible by flow cytometry) together with the production of extracellular matrix (visible by epifluorescence microscopy) after 10 days of immersion in seawater. The final expansion of the biofilm to maturity was visible from day 31 to day 206 on the non-biodegradable polymers (PE, AA_{144}PE, OXO, AA_{48}OXO, and PS), as well as for PLA. Interestingly, the biofilm maturity was not reached for the biodegradable polymers (PCL, PHBV) and for the AA_{144}OXO that continue to increase even after 206 days of incubation in seawater. Few other long-term studies (> 6 months) have also shown limited differences in biofilm maturation on

non-biodegradable polymers, i.e., PE, PP, PET, or polycarbonate (PC) (Webb et al., 2009; De Tender et al., 2017). Our results are consistent with another study underlining the continuous growth of PHBV biofilms in seawater (Dussud et al., 2018b), albeit limited to 45 days of immersion. Our results thus confirm this trend on PHBV but for much longer period (206 days) and extend this observation to PCL and AA_{144}OXO. These results open new questions on the final expansion of the biofilms growing on biodegradable polymers in seawater and call for long-term incubation period in controlled conditions.

Dynamics of Extra- and Intracellular Bacterial Activities on Plastics

This study presents pioneer results of intra- and extracellular activities of biofilms growing on various plastics. Extracellular enzymes are necessary to hydrolyze polymers and organic particles into small molecules (< 600 Da) that can cross the bacterial cell membranes *via* permeases for further intracellular degradation (Azam and Malfatti, 2007). Activities of hydrolytic enzymes such as protease, lipase, and glucosidase have already been examined for various marine particles including suspended particulate matter, marine snow, and sinking particles collected by sediment traps (Severin et al., 2016 and references cited there in), but not on plastic particles. So far, only one study evaluated the intracellular bacterial heterotrophic production on plastics (Dussud et al., 2018b). To the best of our knowledge, this is the first study to merge extra- and intracellular activities. Overall, we found that the measured extra- and intracellular activities gave the same trends, with higher activities found on biodegradable compared to non-biodegradable materials. This result underlines the complementary role of extra- and intracellular enzyme activities to decompose and transform polymers and organic molecules for further metabolization.

The primo-colonizers (day 3) were particularly active whatever the plastic types, as depicted by intracellular heterotrophic activity and also by extracellular aminopeptidase and lipase (not for b-glucosidase). Such activity peak may certainly be due to the utilization of organic matter present in the "conditioning film" that forms rapidly on hard surfaces placed in seawater (Loeb and Neihof, 1975; Dobretsov, 2010).

Thereafter, clear distinction could be made for non-biodegradable vs. biodegradable materials. Both inter- and extracellular activities decreased to remained low values from day 3 and until the end of the experiment on all the conventional materials (PE, AA_{144}PE, OXO, and PS). Interestingly, a significant and consistent decrease was also observed on PLA, a polymer known as biodegradable under industrial composting conditions or degradable in human body (Pillai and Sharma, 2010), but not biodegradable under marine conditions (Karamanlioglu et al., 2017).

Intra- and extracellular activities (including b-glucosidase) remained stable or even increase until 206 days of immersion in seawater for the biodegradable polymers, with higher activities found for PCL and PHBV compared to AA_{144}OXO. This appears consistent based on the intrinsic features of PCL and PHBV whose ester linkages will be degraded by hydrolytic enzymes such as lipases. The potential activity of plastic biodegradation in seawater is determined by several standard tests based on biomass and respirometric activity measurements (mainly CO_2 production) under laboratory conditions during 3 months (ASTM D6691-09), 6 months (ASTM D7473-12), or 24 months (ISO 18830, ISO 19679, ASTM D7991-15). Other activity tests can be considered as alternative methods, such as tests based on ATP measurements (Fontanella et al., 2013) or bacterial heterotrophic production (Jacquin et al., 2021). We are aware that intra- and extracellular bacterial activities under natural conditions may be related to processes other than plastic biodegradation (biodegradation of organic matter and cross-feeding in the biofilm) (Pande et al., 2014), but this study provides a set of congruent results that, although not definitely compelling, gives concrete hints for effective biodegradability in seawater (Jacquin et al., 2021).

Microbial Community Dynamics in Seawater and for Biodegradable and Non-biodegradable Plastics

Illumina MiSeq sequencing provided a set of complementary information to better understand the dynamics of bacterial abundance and activities on plastic described above, including (i) a clear distinction between communities living on plastics and the surrounding seawater, (ii) contrasted communities on biodegradable and non-biodegradable materials after 7 months of immersion in seawater, which allowed to (iii) describe new potential candidates for the biodegradation of PCL, PHBV, and artificially aged OXO in natural seawater.

First, cluster analysis showed significant distinction between bacterial communities living on plastics when compared to the free-living and organic particle-attached fractions. Such observation is now a common feature observed in the oceans worldwide (Wright et al., 2021) that reinforce the originality of the "plastisphere" compared to other microorganisms living in the surrounding seawater. In our study, we noticed that organic particle-attached communities formed a separate group that was more similar to the plastisphere compared to the free-living fraction, as already mentioned on PET drinking bottles and glass substrates in seawaters (Oberbeckmann et al., 2016). These authors suggested that the similarity between organic particle-associated and plastic biofilms may be explained by the presence of non-specific surface-colonizing microbes that represent another part of the diversity around the core plastisphere microbiome. Indeed, surface attachment capabilities of microorganisms can be triggered by organelles (e.g., flagella, pili) (Rogers et al., 2020), hydrophobicity of the outer membrane (e.g., modifications of the lipopolysaccharidic composition of some bacteria allowing better interactions with hydrophobic substances) (Krasowska and Sigler, 2014), or synthesis of surfactants (e.g., higher ability of *Lysinibacillus fusiformis* to degrade polyethylene in the presence of biosurfactants) (Mukherjee et al., 2016). We also found clear dissimilarities between the bacterial communities in the free-living fraction (dominated by Alphaproteobacteria, mainly SAR11) and the organic particle-attached fraction (dominated

by Gammaproteobacteria), which is also a common pattern in seawaters (Li et al., 2021). Both free-living and organic particle-attached communities remained relatively stable during the entire course of the experiment, with classical values found in the Mediterranean seawaters in terms of abundance, heterotrophic bacterial production, and extracellular activities (Severin et al., 2016). These results validated our capability to maintain realistic conditions for up to 206 days in an experimental setup renewed with natural seawater every 30 min.

Second, we observed a succession of communities with clear dissimilarities between biodegradable and non-biodegradable materials after 7 months of immersion in seawater. Such dissimilarities were not found during the primo-colonization (day 3) and the growth of the biofilm (day 10) that showed distinct but close communities whatever the plastic type. Primo-colonizers (day 3) together with bacteria on the growth phase of the biofilm (day 10) belonged to Gammaproteobacteria (mainly *Alteromonadaceae*, *Oceanospirillaceae*, and *Alcanivoracaceae*), which is in accordance with previous studies (Dussud et al., 2018a; Cheng et al., 2021). Under our conditions, significant dissimilarities were observed after 31 days, which corresponds to the maturity of biofilms for non-biodegradable materials on the one hand, and to the continuous growth with high extra- and intracellular activities for biodegradable materials on the other hand. After 31 to 74 days of immersion in seawater, biofilms on PCL and PHBV strongly differed from the mature biofilms of other plastics. AA_{144}OXO also formed a distinct cluster after 116 days. This is the first time such comparison has been reported for long-term studies, as the only one study comparing bacterial abundance, activity, and diversity on biodegradable materials ended their experiment at the beginning of the biofilm maturity, i.e., after 45 days of immersion in seawater (Dussud et al., 2018a). Most of the other long-term studies over a period of more than 6 months restricted their analysis on bacterial diversity colonizing non-biodegradable polymers, such as PE, PP, PET, and PC (Webb et al., 2009; De Tender et al., 2017). We emphasized here that further studies may take into account not only the bacterial diversity living on plastics, but also the extra- and intracellular activities of the biofilm that will provide new insights into the functional role played by the plastisphere in seawaters.

Third, we describe new potential candidates for the biodegradation of PCL, PHBV, and artificially aged OXO in natural seawater, based on the congruent results of biomass increase together with high extra- and intracellular activities. We used similarity percentage analysis (SIMPER, Ghiglione et al., 2012) to identify OTUs primarily responsible for dissimilarities between pairs of PE versus PCL, PHBV, and AA-OXO after 206 days of incubation in seawater. A clear trend was observed with biodegradable polymers being dominated by a low number of highly abundant contributive OTUs when compared to non-biodegradable polymers, suggesting a specialization of the bacterial communities, providing more information to the contrasted results obtained so far, not allowing to answer whether plastics really select for specific microbial communities (Wright et al., 2020). The most important OTUs that influenced the dissimilarity between PCL and PE were *Pseudohongiella* sp. and *Marinobacter* sp. These two genera have never been listed as PCL degraders, but the first was found highly abundant after crude oil pollution (Valencia-Agami et al., 2019; Peng et al., 2020) and the second contains well-known hydrocarbonoclastic species (Grimaud et al., 2012; Cui et al., 2016), which is consistent with the petroleum nature of the polymer. Another contributing OTU was affiliated with Flavobacteriaceae that were already shown as potential PCL degraders (Lopardo and Urakawa, 2019) or capable of using complex carbon sources (Rodriguez-Sanchez et al., 2016). We also identified putative PHBV degraders, some of them being already highlighted in similar studies, such as Bacteroidetes and others presenting the enzymatic machinery for PHA degradation, such as Celeribacters (Volova et al., 2016). We also found *Marinicella litoralis* that has never been described as a potential PHBV degrader to date (Romanenko et al., 2010; Shoji et al., 2014), as well as Rhodobacteraceae that was abundant in all material types with known ability to form biofilm on plastics and to degrade complex organic matter (Kessler et al., 2011; Flood et al., 2018). Finally, putative degraders of artificially aged OXO (AA_{144}OXO) belonged to Gammaproteobacteria, Cellvibrionaceae, Myxococcales, and Flavobacteriaceae, which are classically observed on the plastisphere of various material types found in seawaters including PE (Zettler et al., 2013), PET (Oberbeckmann et al., 2016), and PVC (Pinto et al., 2019). Members of Myxococcales and Flavobacteriaceae presented high hydrolytic enzymes excretion and complex biopolymers degradation capacities (Shimkets et al., 2006; Amaral-Zettler et al., 2020) together with hydrocarbon degradation capabilities (Pollet et al., 2018; Gutierrez, 2019). We are aware that the description of putative OTUs involved in the biodegradation of PCL, PHBV, and AA-OXO are sometimes limited to the poor taxonomic identification based on 16S rRNA metabarcoding; however, it opens new routes for further studies to delve deeper into the understanding of the biodegradability of these materials in seawaters.

CONCLUDING REMARKS

Through the analysis of a broad set of microbial parameters (abundance, diversity, and activities) to describe the evolution of the marine biofilms growing on six different plastic types during a long-term experiment, we demonstrated clear evidence of biodegradation on PCL, PHBV, and artificially aged OXO in seawater. Signs of biodegradation were visible after 1 month and until the end of the experiment, with significant increases of the biofilm biomass, of the intra- and extracellular activities, together with drastic changes in bacterial diversity. In contrast, we found no sign of biodegradation for PE, PS, and PLA under our experimental conditions, where the biofilms became mature after 1 month and remained relatively stable until the end of the experiment. We encourage the recording of these microbial parameters for a comprehensive connection between biofilm formation and polymer degradation when evaluating the plastic biodegradation in seawater, which is currently not taken into account in the current standards (mainly based on respirometry activities and generally performed under laboratory conditions). Our study opens also new routes for further studies

on biodegradation mechanisms, by providing a list of putative OTUs that may serve as model organisms potentially involved in the biodegradation of PCL, PHBV, and artificially aged OXO under natural seawater conditions.

Finally, it is noteworthy that the bio-based polymer PLA showed no signs of biodegradation under our experimental conditions, whereas the fossil-based polymer PCL showed significant evidence of biodegradation. This reinforced the distinction that has to be made between biobased and biodegradable polymers but also the different certification schemes for biodegradation in contrasted environments (compost, freshwater, and seawater) when considering an alternative to conventional fossil-based plastics.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/, PRJEB37662.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CD, A-LM, SB, and J-FG have conceived and designed the study. CD, ML, and CO carried out all the experiments and acquired the data. SB and BE provided the equipment. CD, CO, LP, GD, A-LM, VB, and J-FG analyzed and interpreted the data. CO, CD, VB, and J-FG drafted the manuscript. LP, GD, ML, BE, GB, AT, A-LM, and SB revised the manuscript and approved the version of the manuscript to be published. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was funded by the French National Research Agency (project ANR-OXOMAR), by the Tara Ocean Foundation (project Microplastic 2019), by the European project JRA-ASSEMBLE+, and by the CNRS (project PEPSTI-PHABIO).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Philippe Catala for his laboratory support, to Matthieu George and Pascale Fabre for insightful comments on the manuscript, to G Baby for technical support, and Guigui PA, VF, and JPJS for helpful discussion. This work is part of the Ph.D. thesis of CD supported by the French Ministry of Education.

REFERENCES

Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., and Mincer, T. J. (2020). Ecology of the plastisphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 139–151. doi: 10.1038/s41579-019-0308-0

Attwood, J., Philip, M., Hulme, A., Williams, G., and Shipton, P. (2006). The effects of ageing by ultraviolet degradation of recycled polyolefin blends. *Polym. Degrad. Stab.* 91, 3407–3415. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2006.04.025

Azam, F., and Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 782–791. doi: 10.1038/nrmicro1747

Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., et al. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from *Illumina amplicon* sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi: 10.1038/nmeth.2276

Briand, J. F., Djeridi, I., Jamet, D., Coupé, S., Bressy, C., Molmeret, M., et al. (2012). Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites. *Biofouling* 28, 453–463. doi: 10.1080/08927014.2012.688957

Cheng, J., Jacquin, J., Conan, P., Pujo-Pay, M., Barbe, V., George, M., et al. (2021). Relative influence of plastic debris size and shape, chemical composition and phytoplankton-bacteria interactions in driving seawater plastisphere abundance, diversity and activity. *Front. Microbiol.* 11:610231. doi: 10.3389/fmicb.2020.610231

Chiu, C.-H., Wang, Y.-T., Walther, B. A., and Chao, A. (2014). An improved nonparametric lower bound of species richness via a modified good–turing frequency formula. *Biometrics* 70, 671–682. doi: 10.1111/biom.12200

Cui, H., Su, X., Chen, F., Wei, S., Chen, S., and Wang, J. (2016). Vertical distribution of archaeal communities in cold seep sediments from the Jiulong methane reef area in the South China sea. *Biosci. J.* 32, 43–48.

Dang, H., Li, T., Chen, M., and Huang, G. (2008). Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 52–60. doi: 10.1128/aem.01400-07

De Tender, C., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Vangeyte, J., Cattrijsse, A., et al. (2017). Temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7350–7360. doi: 10.1021/acs.est.7b00697

Dobretsov, S. (2010). "Marine Biofilms," in *Biofouling*, eds S. Durr and J. Thompson (Oxford: Wiley-Blackwell), 123–136. doi: 10.1002/9781444315462.ch9

Dussud, C., Hudec, C., George, M., Fabre, P., Higgs, P., Bruzaud, S., et al. (2018a). Colonization of non-biodegradable and biodegradable plastics by marine microorganisms. *Front. Microbiol.* 9:1571. doi: 10.3389/fmicb.2018.01571

Dussud, C., Meistertzheim, A. L., Conan, P., Pujo-Pay, M., George, M., Fabre, P., et al. (2018b). Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. *Environ. Pollut.* 236, 807–816. doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.027

Edgar, R., Haas, B., Clemente, J., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics Oxf. Engl.* 27, 2194–2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381

Eich, A., Mildenberger, T., Laforsch, C., and Weber, M. (2015). Biofilm and diatom succession on polyethylene (PE) and biodegradable plastic bags in two marine habitats: early signs of degradation in the pelagic and benthic zone? *PLoS One* 10:e0137201. doi: 10.1371/journal.pone.0137201

Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borrero, J. C., et al. (2014). Plastic pollution in the World's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 Tons Afloat at sea. *PLoS One* 9:e111913. doi: 10.1371/journal.pone.0111913

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2017). FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. doi: 10.1093/bioinformatics/btx791

Eyheraguibel, B., Traikia, M., Fontanella, S., Sancelme, M., Bonhomme, S., Fromageot, D., et al. (2017). Characterization of oxidized oligomers from polyethylene films by mass spectrometry and NMR spectroscopy before and after biodegradation by a *Rhodococcus rhodochrous* strain. *Chemosphere* 184, 366–374. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.137

Flood, B. E., Leprich, D., and Bailey, J. V. (2018). Complete genome sequence of *Celeribacter baekalonensis* strain LH4, a thiosulfate-oxidizing Alphaproteobacterial Isolate from gulf of Mexico continental slope sediments. *Genome Announc.* 6:e00434-18.

Fontanella, S., Bonhomme, S., Brusson, J.-M., Pitteri, S., Samuel, G., Pichon, G., et al. (2013). Comparison of biodegradability of various polypropylene films

containing additives based on Mn, Mn/Fe or Co. *Polym. Degrad. Stab.* 98, 875–884. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.01.002

Ghiglione, J. F., Galand, P. E., Pommier, T., Pedrós-Alió, C., Maas, E. W., Bakker, K., et al. (2012). Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17633–17638. doi: 10.1073/pnas.1208160109

Grimaud, R., Ghiglione, J.-F., Cagnon, C., Lauga, B., Vaysse, P. J., Rodriguez-Blanco, A., et al. (2012). Genome sequence of the marine bacterium Marinobacter hydrocarbonoclasticus SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *J. Bacteriol.* 194, 3539–3540. doi: 10.1128/jb.00500-12

Gutierrez, T. (2019). "Aerobic hydrocarbon-degrading *Gammaproteobacteria*: xanthomonadales," in *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, ed. T. J. McGenity (Cham: Springer International Publishing), 191–205. doi: 10.1007/978-3-030-14796-9_4

Harrison, J. P., Schratzberger, M., Sapp, M., and Osborn, A. M. (2014). Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiol.* 14:232. doi: 10.1186/s12866-014-0232-4

Jacquin, J., Callac, N., Cheng, J., Giraud, C., Gorand, Y., Denoual, C., et al. (2021). Microbial diversity and activity during the biodegradation in seawater of various substitutes to conventional plastic cotton swab sticks. *Front. Microbiol.* 12:604395. doi: 10.3389/fmicb.2021.604395

Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., et al. (2019). Microbial ecotoxicology of marine plastic debris: a review on colonization and biodegradation by the "Plastisphere". *Front. Microbiol.* 10:865. doi: 10.3389/fmicb.2019.00865

Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., et al. (2015). Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347, 768–771. doi: 10.1126/science.1260352

Karamanlioglu, M., Preziosi, R., and Robson, G. D. (2017). Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): a review. *Polym. Degrad. Stab.* 137, 122–130. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.009

Kessler, J. D., Valentine, D. L., Redmond, M. C., Du, M., Chan, E. W., Mendes, S. D., et al. (2011). A persistent oxygen anomaly reveals the fate of spilled methane in the deep Gulf of Mexico. *Science* 331, 312–315. doi: 10.1126/science.1199697

Kirstein, I. V., Wichels, A., Krohne, G., and Gerdts, G. (2018). Mature biofilm communities on synthetic polymers in seawater – Specific or general? *Mar. Environ. Res.* 142, 147–154. doi: 10.1016/j.marenvres.2018.09.028

Krasowska, A., and Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:112. doi: 10.3389/fcimb.2014.00112l

Lee, J.-W., Nam, J.-H., Kim, Y.-H., Lee, K.-H., and Lee, D.-H. (2008). Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J. Microbiol.* 46, 174–182. doi: 10.1007/s12275-008-0032-3

Li, J., Gu, L., Bai, S., Wang, J., Su, L., Wei, B., et al. (2021). Characterization of particle-associated and free-living bacterial and archaeal communities along the water columns of the South China Sea. *Biogeosciences* 18, 113–133. doi: 10.5194/bg-18-113-2021

Lobelle, D., and Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Mar Pollut. Bull.* 62, 197–200. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.10.013

Loeb, G. I., and Neihof, R. A. (1975). "Marine conditioning films," in *Applied Chemistry at Protein Interfaces, Advances in Chemistry*, ed. R. E. Baier (Washington, DC: American Chemical Society), 319–335. doi: 10.1021/ba-1975-0145.ch016

Lopardo, C. R., and Urakawa, H. (2019). Performance and microbial diversity of bioreactors using polycaprolactone and polyhydroxyalkanoate as carbon source and biofilm carrier in a closed recirculating aquaculture system. *Aquac. Int.* 27, 1251–1268. doi: 10.1007/s10499-019-00383-5

Magoč, T., and Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963. doi: 10.1093/bioinformatics/btr507

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., and Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ PrePrints* 2:e386v1.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J.* 17, 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200

McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217

Mével, G., Vernet, M., Goutx, M., and Ghiglione, J. F. (2008). Seasonal to hour variation scales in abundance and production of total and particle-attached bacteria in the open NW Mediterranean Sea (0–1000 m). *Biogeosciences* 5, 1573–1586. doi: 10.5194/bg-5-1573-2008

Mukherjee, S., Chowdhuri, U. R., and Kundu, P. P. (2016). Bio-degradation of polyethylene waste by simultaneous use of two bacteria: *Bacillus licheniformis* for production of bio-surfactant and *Lysinibacillus fusiformis* for bio-degradation. *RSC Adv.* 6, 2982–2992. doi: 10.1039/c5ra25128a

Oberbeckmann, S., Löder, M. G. J., and Labrenz, M. (2015). Marine microplastic-associated biofilms – a review. *Environ. Chem.* 12, 551–562. doi: 10.1071/en15069

Oberbeckmann, S., Loeder, M. G., Gerdts, G., and Osborn, A. M. (2014). Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 478–492. doi: 10.1111/1574-6941.12409

Oberbeckmann, S., Osborn, A. M., and Duhaime, M. B. (2016). Microbes on a bottle: substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris. *PLoS One* 11:e0159289. doi: 10.1371/journal.pone.0159289

Pande, S., Merker, H., Bohl, K., Reichelt, M., Schuster, S., De Figueiredo, L. F., et al. (2014). Fitness and stability of obligate cross-feeding interactions that emerge upon gene loss in bacteria. *ISME J.* 8, 953–962. doi: 10.1038/ismej.2013.211

Parada, A. E., Needham, D. M., and Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* 18, 1403–1414. doi: 10.1111/1462-2920.13023

Peng, C., Tang, Y., Yang, H., He, Y., Liu, Y., Liu, D., et al. (2020). Time- and compound-dependent microbial community compositions and oil hydrocarbon degrading activities in seawater near the Chinese Zhoushan Archipelago. *Mar. Pollut. Bull.* 152:110907. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.110907

Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Biol.* 13, 131–144. doi: 10.1016/0022-5193(66)90013-0

Pillai, C. K. S., and Sharma, C. P. (2010). Review Paper: absorbable polymeric surgical sutures: chemistry, production, properties, biodegradability, and performance. *J. Biomater. Appl.* 25, 291–366. doi: 10.1177/0885328210384890

Pinto, M., Langer, T. M., Hüffer, T., Hofmann, T., and Herndl, G. J. (2019). The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession. *PLoS One* 14:e0217165. doi: 10.1371/journal.pone.0217165

Pollet, T., Berdjeb, L., Garnier, C., Durrieu, G., Le Poupon, C., Misson, B., et al. (2018). Prokaryotic community successions and interactions in marine biofilms: the key role of *Flavobacteria*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94:fiy083.

Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D'Antonio, D., Savini, V., and Di Bonaventura, G. (2008). Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol. Lett.* 287, 41–47. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01292.x

Porter, K. G., and Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora1. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943–948. doi: 10.4319/lo.1980.25.5.0943

Poulain, M., Mercier, M. J., Brach, L., Martignac, M., Routaboul, C., Perez, E., et al. (2019). Small microplastics as a main contributor to plastic mass balance in the north atlantic subtropical gyre. *Environ. Sci. Technol.* 53, 1157–1164. doi: 10.1021/acs.est.8b05458

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219

R Core Team (2018). *R version 3.5. 0. R Lang. Environ. Stat. Comput.* Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

RameshKumar, S., Shaiju, P., O'Connor, K. E., and Ramesh, B. P. (2020). Bio-based and biodegradable polymers - State-of-the-art, challenges and emerging trends. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 21, 75–81. doi: 10.1016/j.cogsc.2019.12.005

Rodriguez-Sanchez, A., Purswani, J., Lotti, T., Maza-Marquez, P., van Loosdrecht, M. C. M., Vahala, R., et al. (2016). Distribution and microbial community structure analysis of a single-stage partial nitritation/anammox granular sludge bioreactor operating at low temperature. *Environ. Technol.* 37, 2281–2291. doi: 10.1080/09593330.2016.1147613

Rogers, K. L., Carreres-Calabuig, J. A., Gorokhova, E., and Posth, N. R. (2020). Micro-by-micro interactions: how microorganisms influence the fate of marine microplastics. *Limnol. Oceanogr. Lett.* 5, 18–36. doi: 10.1002/lol2.10136

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584

Romanenko, L. A., Tanaka, N., Frolova, G. M., and Mikhailov, V. V. (2010). *Martinicella litoralis* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from coastal seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1613–1619. doi: 10.1099/ijs.0.016147-0

Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R., and Briand, J.-F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 15, 2879–2893. doi: 10.1111/1462-2920.12186

Schnurr, R. E. J., Alboiu, V., Chaudhary, M., Corbett, R. A., Quanz, M. E., Sankar, K., et al. (2018). Reducing marine pollution from single-use plastics (SUPs): a review. *Mar. Pollut. Bull.* 137, 157–171. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.10.001

Science Advice for Policy by European Academies (SAPEA) (2020). *Biodegradability of Plastics in the Open Environment*. Berlin: SAPEA. doi: 10.26356/biodegradabilityplastics

Selke, S., Auras, R., Nguyen, T. A., Castro Aguirre, E., Cheruvathur, R., and Liu, Y. (2015). Evaluation of biodegradation-promoting additives for plastics. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3769–3777. doi: 10.1021/es504258u

Severin, T., Sauret, C., Boutrif, M., Duhaut, T., Kessouri, F., Oriol, L., et al. (2016). Impact of an intense water column mixing (0-1500 m) on prokaryotic diversity and activities during an open-ocean convection event in the NW Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol.* 18, 4378–4390. doi: 10.1111/1462-2920.13324

Shannon, C. E., and Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication, The Mathematical Theory of Communication*. Champaign, IL: University of Illinois Press.

Shimkets, L. J., Dworkin, M., and Reichenbach, H. (2006). "The myxobacteria," in *The Prokaryotes: Proteobacteria*: Delta, Epsilon Subclass, Vol. 7, eds M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (New York, NY: Springer), 31–115. doi: 10.1007/0-387-30747-8_3

Shoji, T., Sueoka, K., Satoh, H., and Mino, T. (2014). Identification of the microbial community responsible for thiocyanate and thiosulfate degradation in an activated sludge process. *Process Biochem.* 49, 1176–1181. doi: 10.1016/j.procbio.2014.03.026

Simon, M., and Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51, 201–213. doi: 10.3354/meps051201

Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163, 688–688. doi: 10.1038/163688a0

Valencia-Agami, S. S., Cerqueda-Garcia, D., Putxeys, S., Uribe-Flores, M. M., Garcia-Cruz, N. U., Pech, D., et al. (2019). Changes in the bacterioplankton community structure from southern Gulf of Mexico during a simulated crude oil spill at Mesocosm scale. *Microorganisms* 7:441. doi: 10.3390/microorganisms7100441

Volova, T. G., Prudnikova, S. V., and Boyandin, A. N. (2016). Biodegradable poly-3-hydroxybutyrate as a fertiliser carrier. *J. Sci. Food Agric.* 96, 4183–4193. doi: 10.1002/jsfa.7621

Webb, H. K., Crawford, R. J., Sawabe, T., and Ivanova, E. P. (2009). Poly(ethylene terephthalate) polymer surfaces as a substrate for bacterial attachment and biofilm formation. *Microbes Environ.* 24, 39–42. doi: 10.1264/jsme2.ME08538

Wright, R. J., Erni-Cassola, G., Zadjelovic, V., Latva, M., and Christie-Oleza, J. A. (2020). Marine plastic debris: a new surface for microbial colonization. *Environ. Sci. Technol.* 54, 11657–11672. doi: 10.1021/acs.est.0c02305

Wright, R. J., Langille, M. G. I., and Walker, T. R. (2021). Food or just a free ride? A meta-analysis reveals the global diversity of the Plastisphere. *ISME J.* 15, 789–806. doi: 10.1038/s41396-020-00814-9

Yashchuk, O., Portillo, F. S., and Hermida, E. B. (2012). Degradation of polyethylene film samples containing oxo-degradable additives. *Procedia Materials Science* 1, 439–445. doi: 10.1016/j.mspro.2012.06.059

Zettler, E. R., Mincer, T. J., and Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the "Plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146. doi: 10.1021/es401288x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Odobel, Dussud, Philip, Derippe, Lauters, Eyheraguibel, Burgaud, Ter Halle, Meistertzheim, Bruzaud, Barbe and Ghiglione. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 6 :

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 15 July 2021
doi: 10.3389/fmicb.2021.604395

Microbial Diversity and Activity During the Biodegradation in Seawater of Various Substitutes to Conventional Plastic Cotton Swab Sticks

*Justine Jacquin[1,2], Nolwenn Callac[1,3], Jingguang Cheng[1], Carolane Giraud[1,3], Yonko Gorand[4], Clement Denoual[5], Mireille Pujo-Pay[1], Pascal Conan[1], Anne-Leila Meistertzheim[6], Valerie Barbe[7], Stéphane Bruzaud[5] and Jean-François Ghiglione[1]**

[1] CNRS, UMR 7621, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique de Banyuls, Sorbonne Université, Paris, France, [2] Innovation Plasturgie et Composites, Biopole Clermont Limagne, Saint-Beauzire, France, [3] CNRS, UMR 9220 ENTROPIE, Ifremer (LEAD-NC), IRD, Univ Nouvelle-Calédonie, Univ La Réunion, Nouméa, New Caledonia, [4] Plateforme EnRMAT, Laboratoire PROMES, Rambla de la Thermodynamique, Perpignan, France, [5] UMR CNRS 6027, Institut de Recherche Dupuy de Lôme (IRDL), Université de Bretagne-Sud, Lorient, France, [6] SAS Plastic@Sea, Observatoire Océanologique de Banyuls, Banyuls-sur-Mer, France, [7] Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Mechthild Schmitt-Jansen, Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Germany

Reviewed by:
Gabriela Vázquez-Rodríguez, Autonomous University of the State of Hidalgo, Mexico
Christian Lott, HYDRA Marine Sciences GmbH, Germany

***Correspondence:**
Jean-François Ghiglione
ghiglione@obs-banyuls.fr

Specialty section:
This article was submitted to Microbiotechnology, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: *09 September 2020*
Accepted: *12 May 2021*
Published: *15 July 2021*

Citation:
Jacquin J, Callac N, Cheng J, Giraud C, Gorand Y, Denoual C, Pujo-Pay M, Conan P, Meistertzheim A-L, Barbe V, Bruzaud S and Ghiglione J-F (2021) Microbial Diversity and Activity During the Biodegradation in Seawater of Various Substitutes to Conventional Plastic Cotton Swab Sticks. Front. Microbiol. 12:604395. doi: 10.3389/fmicb.2021.604395

The European Parliament recently approved a new law banning single-use plastic items for 2021 such as plastic plates, cutlery, straws, cotton swabs, and balloon sticks. Transition to a bioeconomy involves the substitution of these banned products with biodegradable materials. Several materials such as polylactic acid (PLA), polybutylene adipate terephthalate (PBAT), poly(butylene succinate) (PBS), polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV), Bioplast, and Mater-Bi could be good candidates to substitute cotton swabs, but their biodegradability needs to be tested under marine conditions. In this study, we described the microbial life growing on these materials, and we evaluated their biodegradability in seawater, compared with controls made of non-biodegradable polypropylene (PP) or biodegradable cellulose. During the first 40 days in seawater, we detected clear changes in bacterial diversity (Illumina sequencing of 16S rRNA gene) and heterotrophic activity (incorporation of ^{3}H-leucine) that coincided with the classic succession of initial colonization, growth, and maturation phases of a biofilm. Biodegradability of the cotton swab sticks was then tested during another 94 days under strict diet conditions with the different plastics as sole carbon source. The drastic decrease of the bacterial activity on PP, PLA, and PBS suggested no bacterial attack of these materials, whereas the bacterial activity in PBAT, Bioplast, Mater-Bi, and PHBV presented similar responses to the cellulose positive control. Interestingly, the different bacterial diversity trends observed for biodegradable vs. non-biodegradable plastics allowed to describe potential new candidates involved in the degradation of these materials under marine conditions. This better understanding of the bacterial

diversity and activity dynamics during the colonization and biodegradation processes contributes to an expanding baseline to understand plastic biodegradation in marine conditions and provide a foundation for further decisions on the replacement of the banned single-used plastics.

Keywords: plastisphere, biofouling, plastic biodegradation, single-used plastics, microbial colonization

INTRODUCTION

The growing worldwide use of plastics together with waste mismanagement resulted in an estimated release of more than five trillion plastic particles weighing over 250,000 tons afloat in the oceans, resulting in dramatic toxicological effects along the marine trophic chain (Eriksen et al., 2014; Wang et al., 2019). A large majority of plastic items found at sea is made of polyethylene (PE), polypropylene (PP), and polystyrene (PS), which are more likely to float, and polyvinyl chloride (PVC), nylons, and polyethylene terephthalate (PET), which are more likely to sink (Auta et al., 2017).

Government regulations have been recently established to restrict the use of single-use plastics and promote the biodegradable plastic industry. For example, since 2018, at least 127 countries have established regulations against plastic bags (UNEP, 2018). The European Parliament voted to ban many other single-use plastics for 2021, including plates, cutlery, straws, food containers, and expanded polystyrene cups as well as sticks used for cotton swabs and plastic balloons (Europarl, 2019). Biodegradable plastics have become the focus of recent researches in order to replace conventional materials made of PE, PP, PS, PVC, PET, and other high-molecular compounds. Today, commercially available biodegradable materials are of petrochemical origin, such as poly(butylene succinate) (PBS) and polybutylene adipate terephthalate (PBAT; brand name Ecoflex®), or are bio-based such as polylactic acid (PLA) and polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV). Natural starch is also frequently offered as a solution, blended with petrochemical-based (mainly potato starch for Bioplast©) or bio-based materials (corn starch with PBAT for Mater-Bi©).

Plastic biodegradation is the microbial conversion of all its organic constituents to carbon dioxide, new microbial biomass and mineral salts under oxic conditions, or to carbon dioxide, methane, new microbial biomass, and mineral salts, under anoxic conditions (Science Advice for Policy by European Academies [SAPEA], 2020). The biodegradability of a plastic is defined according to several standards reflecting disposal condition in soil, compost, or aquatic environments. Tests are generally based on respirometry (biological oxygen demand and CO_2 production) attributed to the biodegradation of the plastic by microbial communities, without any other source of carbon in artificial medium, in comparison with cellulose, which serves as a reference control (standards ISO 18830:2016, ISO 19679:2016, ASTM D6691-09). Several drawbacks were pointed out by a recent paper on the ability of current standard protocols to realistically predict biodegradability in the marine environment (Harrison et al., 2018). For example, the use of preselected strains does not take into consideration the large diversity of microorganisms colonizing plastics in natural conditions, also known as the "plastisphere" (Zettler et al., 2013) which is still poorly studied. In addition, the conventional techniques used to measure the biodegradation activity by evolution of O_2 or CO_2 generally require substantial equipment and can limit the number of experimental replicates. Other activity tests can be considered as alternative methods, such as the use of radiolabeled leucine incorporation that has been used for decades in marine microbiology (Kirchman et al., 1985) or tests based on ATP measurements (Fontanella et al., 2013). When introduced in seawater, plastics are rapidly colonized by bacteria. This process has been extensively studied, showing successive phases of biofilm formation (Dang and Lovell, 2000; Lobelle and Cunliffe, 2011; Eich et al., 2015; Erni-Cassola et al., 2019). During the first days at sea, a "conditioning film" made of inorganic and organic matter supports the initial colonization phase generally initiated by Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria, regardless of the material type (Oberbeckmann et al., 2015). A second phase of rapidly growing bacteria is then usually characterized by a succession of Bacteroidetes, Acidobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes, and Planctomycetes (Salta et al., 2013). The last phase corresponds to a mature biofilm that generally appears after 15–30 days at sea and remains stable for several months, and where clear differences in bacterial abundance, diversity and activity, were found between non-biodegradable and biodegradable plastics (Eich et al., 2015; Dussud et al., 2018). Hydrocarbonoclastic bacteria (HCB) such as *Alcanivorax* sp., *Aestuariicella hydrocarbonica*, and *Marinobacter* sp. became abundant in the mature biofilm and were suggested to be potentially involved in the degradation of fossil-based plastics. However, no study has extended the experience by incubating the mature biofilm in minimum medium with the plastic as the only carbon source in order to prove its biodegradation capabilities.

Here, we used hollow cylinder sticks, such as those used for cotton swabs, made of different conventional (PP) and "biodegradable" materials as potential candidates for substitutes to conventional single-use plastics (PLA, PBS, PBAT, Mater-Bi, Bioplast, PHBV, and cellulose). We hypothesized that the properties of the distinct materials would select different marine bacterial communities with specific biodegradation capabilities. We elaborated an original two-step experimental design based on a first colonization step in natural seawater (40 days) followed by a second step of incubation in minimum medium with each plastic type as sole source of carbon and energy (94 days). Temporal dynamics of the biofilms associated with each plastic type were followed by measuring bacterial activity (^{3}H-leucine incorporation), morphology [scanning electron microscopy (SEM)], and diversity (Illumina sequencing of 16S rRNA genes) during the successive colonization and biodegradation phases.

MATERIALS AND METHODS

Plastic Stick Manufacturing Process

The following list respectively, mentions the material type, its trade name, and the supplier: PP (ISPLEN PP 030 G1E, Repsol), PBAT (Ecoflex C1200, BASF), PLA (Ingeo 7001D, Natureworks), Bioplast (Bioplast 400, Biotec), PHBV (PHBHV ENMAT Y1000P, TianAn Bio), Mater-Bi (Mater-Bi EF04P, Novamont), PBS (bioPBS FZ91PB, PTT MCC Biochem), and cellulose (U Bio). PHBV was preferred in this study because it is a short-chain-length polyhydroxyalkanoate (scl-PHA) that is commercially available. Extended physical and chemical characteristics of the material types are given in **Supplementary Table 1**.

In order to manufacture plastic sticks that correspond to the hollow cylinder classically used for cotton swabs, we used a machine (except for cellulose sticks) with a spinning line composed of a SCAMEX single screw extruder with a 20-mm diameter and a L/D = 20 ratio. The machine was equipped with a vertical shaping die tube, a cooling tray, a drawing bench, an online dimensional controller (tolerances ± 0.01 mm), and a winding element. In order to conform the plastic materials to the desired stick form, the extruder was equipped with a suitable tube die tailor-made by the extruder manufacturer.

Extrusion conditions were adapted according to the used plastics and to their physical and chemical characteristics (**Table 1**). Finally, sticks were cut to equivalent dimensions as commercial sticks, i.e., 72-mm length, 2.5-mm outer diameter, and 1.6-mm inner diameter. This study required 300 fragments of 5 mm for each tested material. Except for cellulose, all materials had a hole in the stick.

Incubation Under Natural Seawater Conditions (40 Days)

Each material type was incubated in aquariums with direct circulation to the sea, as previously described (Dussud et al., 2018). Briefly, we used nine identical aquariums consisting of trays with a 1.8-L capacity (Sodispan, Madrid, Spain), in which 1.5 L of 200-µm filtered seawater was continually renewed by direct pumping at 14-m depth in the Banyuls Bay, close to the SOLA marine observatory station (42°29′300 N–03°08′700 E, France). A flow rate of 50 ml min^{-1} was chosen to ensure a sufficient renewal of natural bacteria (every 30 min) and a homogeneous distribution of the plastic pieces in the aquariums during the entire experiment.

Approximately 250 pieces of each material type (PP, PLA, PBS, PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV, or cellulose) in the form of sticks of 0.5-cm length were washed three times with molecular ethanol and rinsed several times with sterile milliQ water before being placed in the aquariums, with the exception of the "control aquarium," which only contained the circulating seawater. Pieces were sampled after 7 (D7), 15 (D15), 30 (D30), and 40 days (D40). Aquariums were kept in the dark to avoid UV-driven degradation of the materials. Throughout the incubation, seawater temperature (between 12.5 and 13.5°C) and salinity (38.5) were monitored in the aquariums and were similar to the data found at the SOLA observatory in the Banyuls Bay during this period[1].

Incubation in Minimum Medium With Plastic Sticks as Sole Carbon Source (94 Days)

After 40 days under natural seawater conditions, the remaining pieces of each of the eight material types were carefully collected with sterilized tweezers and placed in 4-ml flasks (ref. 294330, Interchim, Montluçon, France) containing 2 ml of minimum medium with no other carbon source than the materials. The composition of the minimum medium was modified from Fegatella et al. (1998): NaCl (420 mM), Na_2SO_4 (28.8 mM), KCl (9.39 mM), NaBr (0.84 mM), H_3BO_3 (0.485 mM), $MgCl_2{\cdot}6H_2O$ (0.546 mM), $CaCl_2$ (0.105 mM), NH_4Cl (9.35 mM), $SrCl_2{\cdot}6H_2O$ (0.0638 mM), NaF (0.0714 mM), $NaNO_3$ (0.88 mM), $NaH_2PO_4{\cdot}H_2O$ (0.036 mM), KH_2PO_4 (0.106 mM), $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ (0.04 µM), $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ (0.08 µM), $CoCl_2{\cdot}6H_2O$ (0.04 µM), $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ (0.9 µM), $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$ (0.03 µM), $FeCl_3$ (1.85 µM), thiamine (0.3 µM), biotin (2.1 nM), and vitamin B12 (0.317 nM). Pieces of each material type were sampled after 3 (D40 + 3), 7 (D40 + 7), 15 (D40 + 15), and 94 days (D40 + 94).

Scanning Electron Microscopy

Three pieces of each of the eight material types were fixed at the beginning (D0) and at the end of the experiment (D40 + 94) with the addition of 3% (v/v) glutaraldehyde (final concentration) and stored for at least one night at 4°C. SEM was performed as previously described (Goldstein et al., 1992). Briefly, samples were washed in sodium cacodylate buffer and fixed with 1% osmium tetroxide before using successive EtOH baths (70, 95, and 100%) and liquid CO_2 for dehydration. About 10-nm conductive layer of Au–Pd was then applied on the surface of the samples to allow electron microscopy observation (Hitachi SEM FEG S-4500, Tokyo, Japan).

Heterotrophic Bacterial Production

Incorporation of ^{3}H-leucine is a classical proxy of the bacterial activity in seawater (Kirchman et al., 1985), which has been recently optimized for the plastisphere by Dussud et al. (2018). Bacterial production (BP) was measured on each material type at each sampling time during the colonization and biodegradation phases. A cell detachment pretreatment was applied using three cycles of 3-min sonication bath (Deltasonic, Meaux, France) followed by 3-min vortex at maximum speed (SkyLine, Elmi Ltd., Moscow, Russia). Immediately after cell detachment, ^{3}H-leucine (specific activity 123.8 Ci $mmol^{-1}$; PerkinElmer, Waltham, MA, United States) was added to all samples, which consisted of 1.5 ml of sterilized seawater containing the plastic pieces together with the detached cells. Biotic samples were treated in triplicates, and a fourth one was killed with trichloroacetic acid (TCA 50%) and served as a control of the reaction. Abiotic controls (consisting of plastic sticks of the eight material types incubated in sterile

[1]https://www.somlit.fr/

TABLE 1 | Extrusion conditions for the different plastic types.

Plastic	Temperature zone 1 °C	Temperature zone 2 °C	Temperature zone 3 °C	Temperature die °C	Screw speed tr/min	Pulling speed m/min
PP	220	220	220	220	20	3.50
PLA 7001D	170	180	190	180	25	3.90
PHA Y1000P	180	180	180	180	25	4.00
PBAT C1200	140	160	160	160	15	2.90
PBS FZ91PB	140	140	140	140	20	3.50
Mater-Bi EF04P	140	160	160	160	15	3.15
Bioplast 400	160	160	160	160	15	3.00

PP, polypropylene; PLA, polylactic acid; PHA, polyhydroxyalkanoate; PBAT, polybutylene adipate terephthalate; PBS, poly(butylene succinate).

seawater) were analyzed following the same protocol. The final leucine concentrations were 36 nmol L^{-1} (^{3}H-leucine at 4 nmol L^{-1}) during the colonization phase and 150 nmol L^{-1} after the transfer to minimum medium (^{3}H-leucine at 1 nmol L^{-1}). The saturation of the leucine incorporation was checked during the biodegradation phase, and a higher final leucine concentration was required in order to avoid leucine being limiting (data not shown), explaining why the final leucine concentrations differed between the colonization and degradation phases. The final ^{3}H-leucine concentration was 4.3 nmol L^{-1} for control seawater samples. All samples were treated in triplicates and incubated in the dark at *in situ* temperature (between 12 and 15°C) for 2 h. Incubations were stopped by the addition of 50% TCA (5% final concentration), and the plastic sticks or cell pellets were washed with diluted TCA and then with cold ethanol. Radioactivity was counted after addition of liquid scintillator (Filter Count PerkinElmer) on a HIDEX 300 SL scintillation counter (LabLogic Systems, Inc., Tampa, FL, United States).

The empirical conversion factor of 1.55 ng C $pmol^{-1}$ of incorporated leucine was used to calculate BP (Simon and Azam, 1989). Because the exact surface of plastic sticks was difficult to measure (several layers for the cellulose, etc.), each piece was weighted with precision balance of sensitivity 0.1 mg (Precisa 125A, Swiss Quality; Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Switzerland), and the results were expressed in ng $C{\cdot}g^{-1}{\cdot}h^{-1}$.

DNA Extraction, PCR, and Sequencing

For each material type, individual pieces were taken at all sampling times and stored at −80°C until DNA extraction. In parallel, 1 L of seawater was sampled in the control aquarium and successively filtered onto 3- and 0.2-µm pore size polycarbonate filters (47-mm diameter, Nucleopore), and filters were stored at −80°C until analysis. DNA extractions were performed on plastic sticks or filters using a classical phenol–chloroform method (Sauret et al., 2016) with slight modifications of the method for plastic samples (Debeljak et al., 2016). Briefly, the same cell detachment pretreatment was used as for BP (see above) before enzymatic and chemical cell lysis [incubation with 1 mg ml^{-1} of lysozyme at 37°C for 45 min followed by 1 h at 50°C with 0.2 mg ml^{-1} of proteinase K and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)]. DNA was quantified by spectrophotometry (Quant-iT^{TM} PicoGreen^{TM} dsDNA Assay Kit, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States).

PCR amplification of the V4–V5 region was performed using the primers 515-FY (5′-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3′) and 926-R (5′-CCG YCA ATT YMT TTR AGT TT-3′) (Fuhrman et al., 1989), which are particularly well suited for marine samples (Parada et al., 2016). Sequencing was performed on Illumina MiSeq by MrDNA (Molecular Research LP, Shallowater, TX, United States) and Integrated Microbiome Resource (IMR; Dalhousie University, Halifax, NS, Canada). The sequences were analyzed using FROGS pipeline hosted in the Galaxy platform (Escudié et al., 2018), following the guidelines given in the publication. Briefly, the forward and reverse reads were assembled; and sequences were clustered using the SWARM algorithm (Mahé et al., 2014) and an aggregation distance of 3. Then, chimeras were removed using the FROGS Vsearch tool (Rognes et al., 2016). An additional filter step was used on the abundance at a 5×10^{-5} threshold to select the most relevant operational taxonomic unit (OTU) sequences. The taxonomic affiliation was assigned by standard nucleotid BLAST (Camacho et al., 2009) using the SILVA 132 database 16S (Quast et al., 2013). Chloroplast, mitochondrial, and eukaryotic sequences were removed. All the 16S rRNA data are available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive (SRA) repository (accession number PRJNA649857).

Statistical Analysis

In order to allow normalization and comparisons of the data, bacterial sequences of each sample were randomly resampled in the OTU file based on the sample with the fewest sequences (n = 9,698). These data sets were used to conduct all the analyses performed using the Rstudio software[2]. The α-diversity indices (Chao1, Shannon, evenness, and Simpson) and the β-diversity analysis (the Bray–Curtis similarity) were calculated with the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013).

Differences between material types were tested using an ANOVA test and confirmed by a *post hoc* Tukey test. Results were considered to be significant if the p value was less than 0.05. Dendrogram was obtained based on the dissimilarity matrix of the Bray–Curtis and applying the Ward algorithm (Ward, 1963).

OTUs responsible for dissimilarities between pairs of clusters from the start and the end of incubation in

[2]https://www.r-project.org/

minimum medium were identified using similarity percentage (SIMPER, PRIMER 6).

RESULTS

Scanning Electron Microscopy on the Different Plastic Types

Polypropylene, PLA, and PBS surfaces showed no visible signs of biodegradation (cracking, deformation, and holes). In addition, bacterial-cell structures on these materials were scarce and dispersed on the surface after 40 days in natural seawater followed by 94 days in minimum medium (D40 + 94). Abundant microbial colonization was observed on the surface of the other materials (PHBV, Mater-Bi, cellulose, and Bioplast), which is typical of a mature biofilm (**Figure 1**).

Three-dimensional biofilm structures were visible on the more colonized plastics, where cells colonized not only the surface layers but also the inner part of the visible cracks. A large diversity of morphological forms including spherical, rod-shaped, or spiral-shaped bacterial-like structures were observed on the surface of most of the materials. Extensive exopolysaccharide matrix was found except for PP, PLA, and PBS.

Bacterial Production During the Successive Phases of Colonization and Transfer to Minimum Medium

During the colonization phase in natural seawater, BP was generally higher during the growth phase of the biofilm from 7 to 15 days. The highest BP values were found for PP, Bioplast, and PHBV (15.9, 12.4, and 10.5 ng $C{\cdot}g^{-1}{\cdot}h^{-1}$, respectively), whereas others (PLA, PBS, PBAT, and cellulose) ranged from 2.2 to 6.5 ng $C{\cdot}g^{-1}{\cdot}h^{-1}$ during this colonization phase (**Figure 2A**). At the end of the colonization phase in natural seawater (D40), BP was even more homogeneous between the material types, ranging from 1.6 to 4.0 ng $C{\cdot}g^{-1}{\cdot}h^{-1}$ for PP, PLA, PBS, PBAT and from 4.7 to 8.1 ng $C{\cdot}g^{-1}{\cdot}h^{-1}$ for Mater-Bi, Bioplast, PHBV, and cellulose. Bacteria living under control seawater conditions showed stable BP during the 40 days, ranging from 12.4 to 22.3 ng $C{\cdot}L^{-1}{\cdot}h^{-1}$ (**Supplementary Table 1**). No comparison was made between the BP values recorded between the seawater and the plastic sticks because of different measure units.

In order to anticipate the decrease of bacterial heterotrophic activity after the transfer of the plastic together with their biofilms into a minimum medium with the plastic as sole carbon source, we have changed the dilution factor of ^{3}H-leucine added to the samples at day 40 accordingly to previous results (data not shown). It did not modify the leucine uptake, but it resulted in an increase of BP values by a factor of 5.8 ± 2.9 (n = 8) for all material types. This transfer from natural seawater to minimum medium resulted in different response scenarios according to the plastic types (**Figure 2B**). A first scenario was found for PP, PLA, and PBS where the BP increased during the first week of incubation in minimum medium (with maxima of 58.8, 85.9, and 94.2 ng $C{\cdot}g^{-1}{\cdot}h^{-1}$ at D40 + 3 or D40 + 7) and dramatically decreased thereafter (7.3, 8.7, and 11 ng $C{\cdot}g^{-1}{\cdot}h^{-1}$ at D40 + 94). A second scenario was observed for PBAT, Mater-Bi, Bioplast, PHBV, and cellulose, where the BP remained relatively stable after the transfer into minimum medium (41.0, 18.6, 39.8, 59.2, and 21.9 ng $C{\cdot}g^{-1}{\cdot}h^{-1}$ at D40 + 94).

Bacterial Community Structure, Diversity Indices, and Taxonomy During the Successive Phases of Colonization and Transfer to Minimum Medium

A total of 5,427,894 paired-end reads were acquired after sequencing all samples. After normalization based on the sample with the fewest merged sequences (n = 9,698), 3,772,255 sequence tags were selected belonging to 978 OTUs (0.03 distance threshold). The seawater control at D40 was sequenced several times, but each sequencing failed for unknown reasons.

Changes in α-Diversity Indices

α-Diversity was studied using Chao1 richness, Pielou evenness, and Shannon diversity indices. Regardless of the plastic type, richness rapidly increased during the first 15 days of colonization and reached between 120 and 384 estimated OTUs after 40 days (**Supplementary Table 2**). The transfer to minimum medium did not influence richness (± 50 estimated species) for some material types including PP, PLA, PBS, and Bioplast but resulted in a decrease for PBAT, Mater-Bi, PHBV, and cellulose when comparing D40 and D40 + 94. We observed that the Chao1 index was statistically linked to the material type after the transfer to minimum medium (ANOVA, p value = 0.0147).

The Pielou evenness index showed relatively homogeneous diversity during the colonization phase, with evenness > 0.5 for all plastics after 40 days (**Supplementary Table 2**). A slight increase was found after the transfer in minimum medium for PP, Bioplast, PHBV, and cellulose, as correlated with the Chao1 index ($p < 0.05$), whereas it slightly decreased for PLA, PBS, PBAT, and Mater-Bi at the end of the incubation.

The resulting Shannon diversity was consistent with the Pielou and Chao1 indices. During the colonization phase, a decrease in the Shannon diversity index was found for the PP (2.4) due to its decrease in evenness (**Table 1**). A diversity increase was found for all the other plastics at D40 (between 2.64 and 4.40). The transfer to minimum medium resulted in an increase in diversity until the end of the experiment (between 3.67 and 3.9 at D40 + 94) for PP, PHBV, and cellulose according to the increase in evenness. Conversely, a decrease of the Shannon diversity (between 2.1 and 3.64) was caused by a decrease in richness for PBS, PBAT, and Mater-Bi or by a decrease in evenness for PLA and Bioplast.

Microbial Communities on Plastics During the Colonization Phase in Seawater

The first colonizers growing on five of the seven plastic types immersed in seawater (PP, PLA, PBS, PBAT, and Mater-Bi) presented very similar communities (D7 and D15 of all material types grouped in Cluster 1) (ANOVA, p value = 0.221 and 0.121 for D7 and D15, respectively). Alphaproteobacteria represented 52% of the total OTU abundance in each sample, followed by Gammaproteobacteria (30%) and Bacteroidia

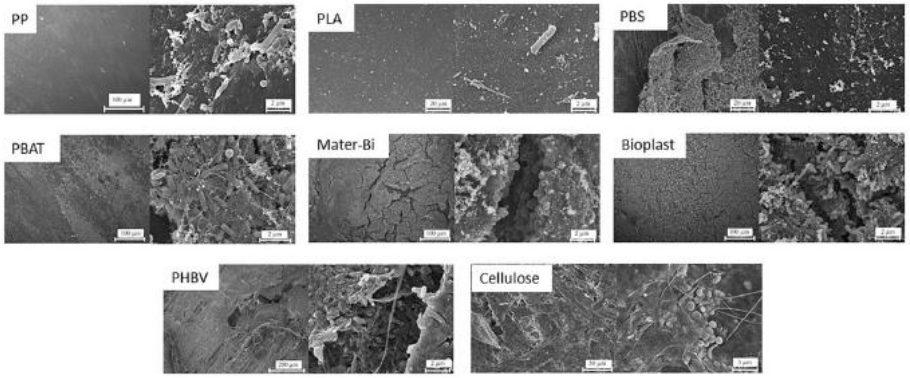


FIGURE 1 | Scanning electron microscopy of the eight polymer types (PP, PLA, PBS, PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV, and cellulose) showing the diversity of morphologies and abundance of bacteria cell-likes structures after 40 days in natural seawater followed by 94 days in minimum medium (D40 + 94). PP, polypropylene; PLA, polylactic acid; PBS, poly(butylene succinate); PBAT, polybutylene adipate terephthalate; PHBV, polyhydroxybutyrate-valerate.

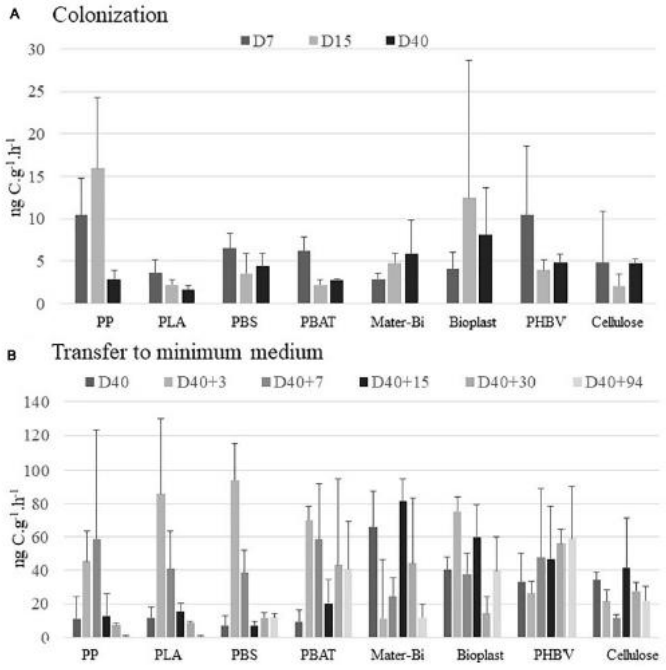


FIGURE 2 | Bacterial production (in ng C-g^{-1}·h^{-1}) **(A)** during the colonization phase in natural seawater at days 7 (D7), 15 (D15), and 40 (D40) and **(B)** after the transfer to minimum medium during 3 (D40 + 3), 7 (D40 + 7), 15 (D40 + 15), 30 (D40 + 30), and 94 days (D40 + 94). The vertical bars represent the average of the bacterial production for each material ($n = 3$) ± standard deviation. Changes in BP values at D40 between panels **(A,B)** correspond to changes on dilution factor of the ^{3}H-leucine added (see section "Materials and Methods"). BP, bacterial production.

(9%). The two most represented families were affiliated to the Alphaproteobacteria, with the Rhodobacteraceae (24%) (mainly *Sulfitobacter* sp. and *Pseudopelagicola* sp.) and the Metyloligellaceae (21%). Flavobacteriaceae (6.7%) (mainly *Croceibacter* sp. and *Aquibacter* sp.) and Nitrinocolaceae (mainly *Neptunibacter* sp.) (5.5%) were also abundant during this stage. Bacteria growing on Bioplast and cellulose were grouped in a separate cluster (Cluster 3, **Figure 3**), with a lower majority of Alphaproteobacteria (32%) and higher presence of Bacteroidia (25%), together with similar abundance of Gammaproteobacteria (30%) as compared with the other plastic types (see above). Alteromonadaceae family dominated (24.5%) and was mainly represented by the *Alteromonas* sp. and *Marinobacter* sp. Flavobacteriaceae family represented 22% of the biofilm community, mainly represented by the *Wenyingzhuangia* sp. Finally, like the other materials, the Rhodobacteraceae family was very abundant (21%) and was mainly represented by the genus *Sulfitobacter* sp.

Clear changes in bacterial community structures were observed after the growth phase, with clear dissimilarities between the distinct plastic types after 40 days in natural seawater (D40). PP and PLA biofilms (Cluster 2) were dominated by Alphaproteobacteria (Rhodobacteraceae) and Bacteroidia (Flavobacteriaceae). PBS and PBAT (Cluster 5) were dominated by Alphaproteobacteria (mainly Rhodobacteraceae) and Gammaproteobacteria (mainly Solimonadaceae). Bioplast and cellulose (Cluster 4) were dominated by Alphaproteobacteria (mainly Hyphomonadaceae) and Gammaproteobacteria (mainly Alteromonadaceae).

PHBV was dominated by Alphaproteobacteria (Rhodobacteraceae) followed by Gammaproteobacteria (Cellvibrionaceae) and finally Bacteroidia (Flavobacteriaceae). As for Mater-Bi, its mature biofilm was dominated by Alphaproteobacteria (Rhodobacteraceae), followed by Gammaproteobacteria (Spongiibacteraceae) and Bacteroidia (Flavobacteriaceae).

Biofilm Specialization After Transfer to Minimum Medium

The transfer from natural seawater to minimum medium resulted in bacterial community changes following three different scenarios according to the material types. First, the structures of the bacterial communities associated with PP, PBAT, and PBS remained stable and distinct during the 94 days of incubation. The second scenario was shared between most of the plastic types, where the initial biofilm, established during the colonization phase, remained stable for 1 week after the transfer in minimum medium (D40 + 7) and then switched to another community that remained stable until the end of the experiment (D40 + 94). This scenario was found for Bioplast, Mater-Bi, PHBV, and cellulose, even though bacterial communities growing on each material were grouped in distinct sub-clusters. A third scenario was found for PLA, which presented a chaotic dispersion of the bacterial communities among all other clusters, even if the community at the end of the experiment clustered in the Cluster 7, together with three sub-clusters composed of (i) Mater-Bi, (ii) Bioplast, and (iii) PLA, PHBV, and cellulose. A drastic increase of Bacteroidetes and a decrease of Alpha- and Gammaproteobacteria was observed at the end of the experiment (D40 + 94) in Cluster 7. The evolution of the major OTUs found on each plastic type at the beginning (D40) and at the end (D40 + 94) of the incubation in minimum medium is described in detail in **Figure 4**.

During seawater incubation, the mature biofilm associated with the non-biodegradable PP and PLA (D40) was largely dominated by *Polycyclovorans* sp. and *Marivita* sp. (more than 62 and 49% for PP and PLA, respectively). These two OTUs became scarce at the end of the incubation in minimum medium (<2.3% at D40 + 94). Bacterial lineages present on PP after 94 days under this drastic condition were hydrocarbonoclasts *Balneola* sp., *Marinobacter* sp., *Winogradskyella* sp., and *Lewinella* sp., explaining 13.15% of the difference between D40 and D40 + 94 and representing 20% (SIMPER analysis) of the relative abundance of the biofilm during the specialization phase. The major OTU at D40 + 94 on PLA was *Planctomicrobium* sp. (56.7% of the community), which contributed to 32.31% of the difference with D40 (SIMPER analysis), where it was not detected. Other genera have emerged at D40 + 94 on this plastic such as *Arenibacter* sp., *Aureisphaera* sp., and *Marixanthomonas* sp. representing almost 11% of the relative abundance at the end of the incubation.

The mature biofilm on PBS (D40) was dominated by *Maribius* sp., *Neptuniibacter* sp., and *Bacillus* sp. representing nearly 21% of the total OTUs, while these three genera represented only 0.64% at D40 + 94. At the end of the experiment (D40 + 94), the biofilm was dominated by *Filomicrobium* sp. (31%), *Thalassobius* sp. (3%), and *Bythopirellula* sp. (2%) explaining about 23% of the disparity with the D40. These three bacterial genera were scarce until transfer into minimum medium (3%).

The dominant OTUs found in the mature biofilm (D40) on PBAT were Rhodobacteraceae at 20.37% (*Marivita* sp., *Lentibacter* sp.), Solimonadaceae at 7.1% (*Lewinella* sp.), and Methylologellaceae at 5.6% and then switched to Saprospiraceae (42.5%) and *Filomicrobium* sp. (15.8%) at D40 + 94. These two OTUs alone explained 34.6% of the difference between the two sampling dates. As already found for PP and PLA, *Polycyclovorans* sp. was very abundant at D40 (7.1%) and was no longer detected at D40 + 94.

Incubation in minimum medium with Mater-Bi as sole carbon source resulted in the selection of *Aquimarina* sp., *Winogradskyella* sp., *Maritimibacter* sp., and *Filomicrobium* sp., which represented nearly 48% of the total OTUs at D40 + 94 but less than 2% at D40. These four genera explained 27.8% of the difference between the two sampling dates based on SIMPER analysis.

The OTUs selected at D40 + 94 for Bioplast were dominated by Microtrichaceae (12%), which belonged to the rare biosphere at D40 (<0.05%). Other genera emerged (> 9%) including *Aliiglaciecola* sp., *Filomicrobium* sp., and *Flexithrix* sp., while representing low abundance at D40 (<0.4%). On the contrary, *Alteromonas* sp. and *Oleibacter* sp. were abundant (8.8%) at D40 and became rare at D40 + 94 (<0.05%).

Selection on minimum medium with PHBV as sole carbon source showed the emergence of *Sphingorhabdus* sp., *Lewinella*

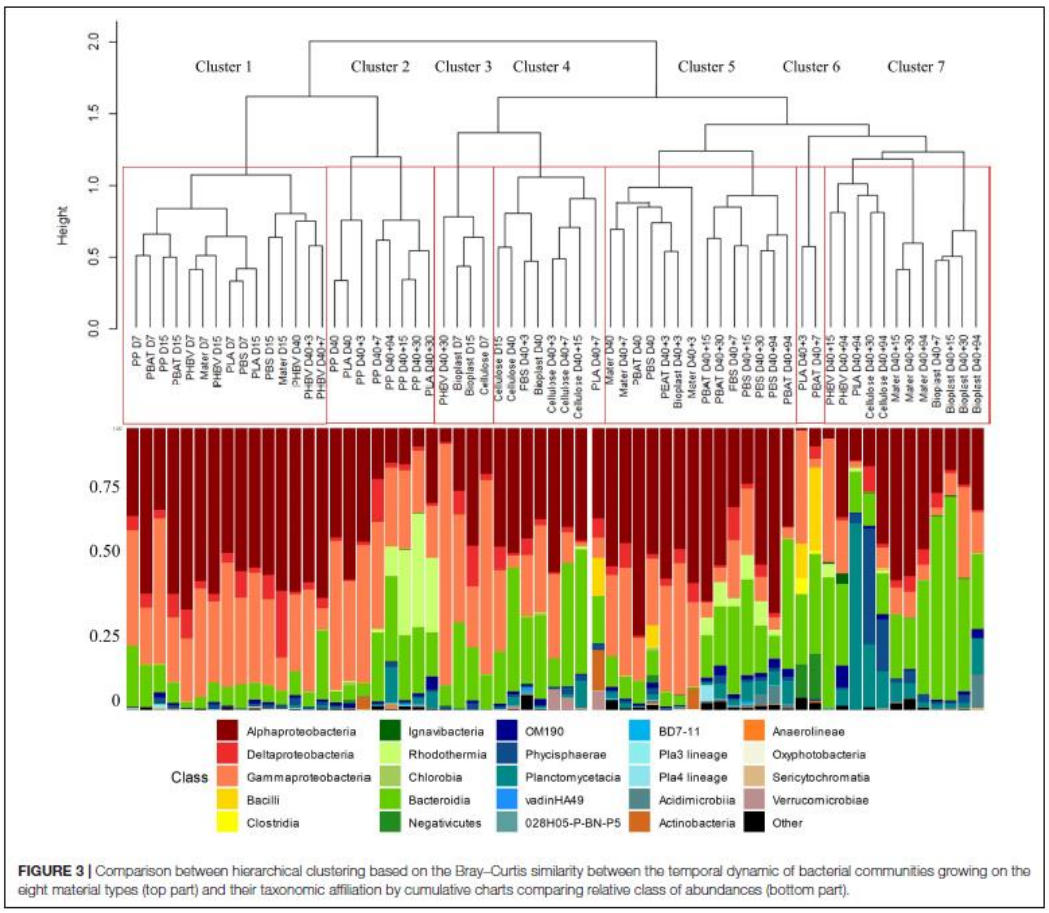


FIGURE 3 | Comparison between hierarchical clustering based on the Bray–Curtis similarity between the temporal dynamic of bacterial communities growing on the eight material types (top part) and their taxonomic affiliation by cumulative charts comparing relative class of abundances (bottom part).

sp., *Pseudahrensia* sp., and *Marinobacter* sp. (> 21% after D40 + 94 and <0.6% at D40), which explained 17.26% of the difference between D40 and D40 + 94 according to SIMPER analysis (**Figure 4**), whereas the dominant *Sedimentitalea* sp., *Thalassotalea* sp., and *Lentibacter* sp. at D40 (20% of the total OTUs) represented less than 0.1% at D40 + 94.

Cellulose selected *Parvularcula* sp., *Oleiphilus* sp., *Pirellula* sp., and *Phycisphaera* sp. at D40 + 94 (21.5% of the total OTUs at D40 + 94 compared with <1.5% at D40), which explained 16% of the difference between the two sampling dates. *Hirschia* sp. remained relatively stable between D40 (11.4%) and D40 + 94 (7.32%).

We finally focused on 35 different genera present on all the plastics and that may be considered as potential HCB. In this functional group, Gammaproteobacteria were overrepresented (40% of putative hydrocarbon degraders) followed by Bacteroidia (31%) and Alphaproteobacteria (23%). The most abundant genera potentially involved in hydrocarbon degradation were *Neptuniibacter* sp., *Sulfitobacter* sp., *Balneola* sp., *Lentibacter* sp., and *Marinobacter* sp., which represented 52% of the total OTUs. Overall, putative HCB were abundant during the growth and maturation phases of the biofilms in seawater (between 8.4 and 38.0% of the total communities), with higher abundance generally found during the growth phase for all plastics (**Table 2**). Interestingly, the putative HCB decreased drastically until the end of the incubation in minimum medium with the plastics as sole carbon sources (D40 + 94). One exception was found for PP, which showed the highest percentage of putative HCB on the mature biofilm (38%), with even higher percentage found after 30 days in minimum medium (63.6%) mainly composed of *Balneola* sp., *Winogradskyella* sp., and *Marinobacter* sp. Other putative HCBs, such as *Polycylovorans* sp., *Neptuniibacter* sp., *Croceibacter* sp., and *Colweillia* sp. (**Figure 4**), were found in seawater during the colonization phase of most of

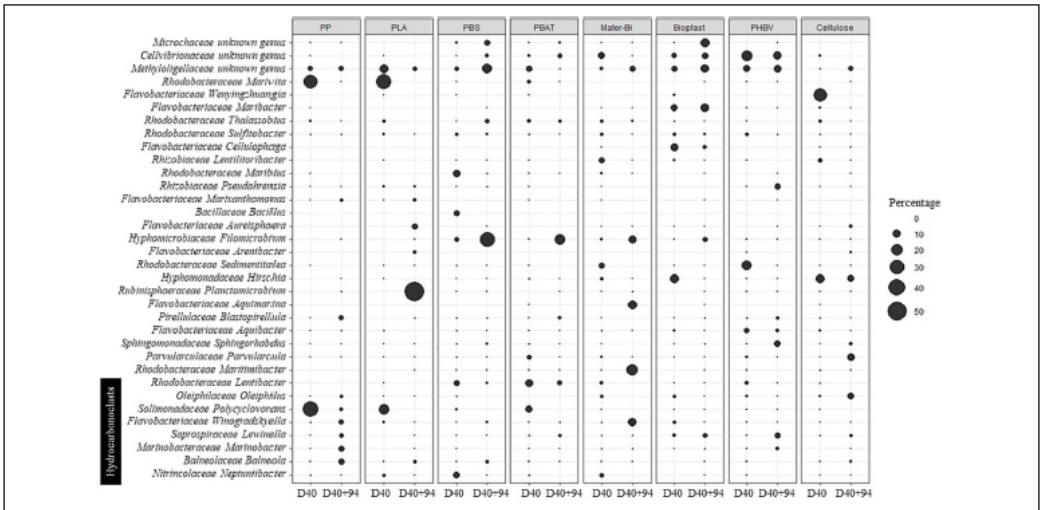


FIGURE 4 | Evolution of the major OTUs (> 4%) on the different materials according to the date of incubation in seawater for 40 days (D40) and in minimum medium for 94 days (D40 + 94). OTUs, operational taxonomic units.

TABLE 2 | Percentage of OTU selected as putative HCB on each material (PP, PLA, PBS, PBAT, Mater-Bi, Bioplast, PHBV, and cellulose) according to the date of incubation in seawater during 7, 15, and 40 days (D40) followed by the transfer in minimum medium during 3 (40 + 3), 7 (40 + 7), 15 (40 + 15), 30 (40 + 30), and 94 days (40 + 94).

	Natural seawater			Minimum medium				
Days	**7**	**15**	**40**	**40 + 3**	**40 + 7**	**40 + 15**	**40 + 30**	**40 + 94**
Bioplast	21.1	21.6	12.1	55.1	7.1	9.6	5.8	6.6
Mater-Bi	23.0	14.5	13.3	37.3	19.5	6.2	10.7	13.4
PBAT	31.9	21.3	21.0	54.7	4.8	26.3	19.9	8.6
PBS	21.7	20.7	19.8	12.4	32.7	27.7	22.9	8.6
PHBV	16.0	18.5	8.4	33.4	15.8	8.3	46.1	11.1
PLA	35.1	22.3	22.7	1.4	20.1	NA	35.5	4.9
PP	32.5	26.6	38.0	21.3	37.8	60.2	63.6	26.6
Cellulose	17.4	16.3	11.2	14.1	13.9	3.3	0.9	12.3

OTU, operational taxonomic unit; HCB, hydrocarbonoclastic bacteria; PP, polypropylene; PLA, polylactic acid; PBS, poly(butylene succinate); PBAT, polybutylene adipate terephthalate; PHBV, polyhydroxybutyrate-valerate.

the materials but did not succeed in colonizing the plastics in minimum medium.

DISCUSSION

Formation of Mature Biofilms on all Plastic Types in Seawater

Aquarium With Direct Circulation to the Sea Mimics the Natural Seawater Conditions of the North Western Mediterranean Sea

The colonization of the different material types was feasible thanks to distinct incubation in aquariums with seawater renewal every 30 min. These aquariums presented similar hydrological conditions to those found at the SOLA observatory in the Banyuls Bay (NW Mediterranean Sea, France). During the first 40 days of incubation in seawater, temperature (13°C ± 0.5°C), chlorophyll *a*, and nutrient values (data not shown) were similar to those usually observed at the long-term SOLA observatory station (Ghiglione et al., 2005; Lambert et al., 2019). Bacterial heterotrophic activity in seawater, measured by ^{3}H-leucine incorporation, reached 22.3 ng C·L^{-1}·h^{-1}, which was similar to what was generally reported *in situ* in the NW Mediterranean Sea (Pulido-Villena et al., 2012). These results showed that incubation in our aquariums with direct circulation to the sea allowed to reproduce environmental conditions, thus making extrapolation of our results to natural seawater possible.

Growth and Maturation Phases of the Biofilms on all the Plastic Types in Seawater

In agreement with patterns observed in another study (Salta et al., 2013), we found a succession of growth and maturation phases of the biofilms for all the material types during the first 40 days of incubation in natural seawater. Each phase was linked with bacterial communities that were similar during the growth phase but became specific to the material types when the mature biofilm formed. This result is in agreement with a previous study conducted in the same region (Dussud et al., 2018).

Bacterial heterotrophic activity peaked during the growth phase of the biofilm in all plastic types (either after 7 or 15 days). These bacterial communities were very similar regardless of the plastic types, except for Bioplast and cellulose, which clustered in another group. This result was surprising considering the distinct chemical material compositions and surface properties of the plastics used in our study. It is noteworthy that bacterial communities growing on Mater-Bi (about 60% corn starch and 40% PBAT) did not cluster with cellulose and Bioplast at this stage (about 40% potato starch and 60% PLA), probably because of different surface properties of the materials that may be related to distinct polymer compositions together with the unknown effect of potentially incorporated additives (not mentioned by the manufacturer). Indeed, early stages of biofilm formation have been depicted as strongly dependent on the surface properties of plastics, including hydrophobicity, structure, and roughness (Lorite et al., 2011). This was not obvious for immersed plastics in seawater, since our results were similar with other studies that did not find distinct communities during the first weeks of biofilm formation on different plastic types (Harrison et al., 2014; De Tender et al., 2017; Dussud et al., 2018). Regardless of the plastic type, the first growth phase was mainly dominated by Proteobacteria (84% of the total abundance on all materials), followed by Bacteroidetes (12.5%). The dominance of Proteobacteria during the first stage of colonization has already been described on the plastisphere (Jacquin et al., 2019). The main classes of the Proteobacteria were Alphaproteobacteria (47.14%, mainly Methyloligellaceae and Rhodobacteraceae) and Gammaproteobacteria (31.46%). The Methyloligellaceae family has already been isolated on other plastic types such as polyamide, polycarbonate, or PP (Feng et al., 2020). All studied plastics were mainly colonized by members of the Rhodobacteraceae during the colonization phase and the specialization phase. This family has been depicted as a key taxonomic group in marine biofilm formation on different material types (Elifantz et al., 2013; Kviatkovski and Minz, 2015; Roager and Sonnenschein, 2019), which explained its large presence on the tested plastics. During the colonization phase, the Flavobacteriaceae family and particularly the genus *Neptuniibacter* sp., generally able to degrade hydrocarbons, was found in abundance on PLA, PBS, and Mater-Bi (Gutierrez, 2019). This result is consistent with a previous study that showed its presence only during the primary colonization phase of plastics under similar conditions (Dussud et al., 2018). In all material types, the mature biofilm that formed after 40 days of incubation in seawater showed lower values of bacterial heterotrophic activity compared with the growth phase. This is consistent with observations made in the unique study measuring bacterial heterotrophic activities on the plastisphere (Dussud et al., 2018). It can be explained by the equilibrium reached by a biofilm at its maturity, which is related to the decrease of available labile inorganic and organic matter and also to the complex interactions (competition, commensalism, etc.) between species coexisting on plastics (Lorite et al., 2011; Henson and Phalak, 2017). Diversity in mature biofilms became specific for each plastic type, which is consistent with observations made in the natural environment (Webb et al., 2012; De Tender et al., 2017; Pinto et al., 2019).

Convergent Signs of Biodegradation for Some Plastic Types

As recommended in several standard tests (ISO 18830:2016, ISO 19679:2016, and ASTM D6691-09), the biodegradation of the studied plastics was tested after transferring the plastic pieces into minimum medium with no other carbon or energy source (ISO 18830:2016, ISO 19679:2016). As suggested in these tests, we used cellulose as a positive control, and we considered PP as a negative control since its biodegradation was previously depicted to take years or decades in the environment (Barnes et al., 2009). Standards allow the possibility of using two types of inoculum, i.e., artificial mixing of culture of microorganisms or bacterial communities from natural seawater. These methods have been criticized since they are not able to reproduce the mature biofilms usually found on plastics in the environment (Harrison et al., 2018; Jacquin et al., 2019). In our study, we followed the development of a natural mature biofilm on eight different material types (40 days' incubation in seawater) before using that biofilm as an inoculum for further biodegradation tests.

After 94 days in minimum medium, SEM observations showed no surface modifications for PP, PLA, and PBS, whereas PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV, and cellulose exhibited observable morphological alterations, with clear evidence of swelling and erosion. Visible alterations of plastic surfaces are considered to be suitable signs of biodegradation, even if these alterations alone are not sufficient (Zettler et al., 2013). Plastics, such as PHBV, are known to undergo biofragmentation by numerous exo-enzymatic actions (amylases, proteases, and nucleases), leading to weakening of the surface of the material (Deroiné et al., 2014a, 2015). Our results are consistent with a previous study showing evidence of faster degradation of PHAs in seawater compared with other plastics such as PBS, PBAT, or PLA (Sashiwa et al., 2018). In our conditions, PHBV showed more cracks, holes, and colonization features than PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV, and cellulose (**Figure 1**). In parallel, SEM observations at the end of the experiment showed dispersed and isolated bacteria for PP, PLA, and PBS, whereas dense biofilms with a three-dimensional structure and substantial extracellular matrix were found for all the other plastics. PLA was previously found to degrade very slowly in seawater and remain stable at room temperature (Deroiné et al., 2014b), while PBS degradation was found to be slower when salinity increased

(Silva Dutra et al., 2019), which are also consistent results with our observations. In our conditions, the radiolabeled leucine incorporation as a proxy of bacterial biodegradation has drawn the same conclusion as the SEM analysis. Interestingly, this is the first time that this technique has been used for this purpose, whereas it has been used for decades to measure the microbial heterotrophic activity and growth in seawater (Kirchman et al., 1985).

It has been successfully used to prove the biodegradability of several other substrates, such as antifouling biocides (Maraldo and Dahllöf, 2004), hydrocarbons (Peng et al., 2020), plasticizers, and flame retardants (Vila-Costa et al., 2019), but never for plastic materials in seawater, probably because of the lack of studies in marine environments. In seawater, this technique is generally preferred to respirometry measurements (O_2 consumption or CO_2 production) because its sensitivity is more suitable in oligotrophic waters (Briand et al., 2004; Pulido-Villena et al., 2012). Current standards are based on respirometry analyses and generally measure CO_2 by gas chromatography, total organic carbon analyzer, infrared analyzer (ISO 14855-1), or CO_2 capture by soda lime (ISO 14855-2). These experimental approaches can be automated but require a significant financial investment and large laboratory spaces, which can reduce the number of experimental replicates. This has already been described as one of the limitations of the current standards on plastic biodegradation (Harrison et al., 2018). Here, we found that other activity tests based on ^{3}H-leucine incorporation were well suited for biodegradation tests of plastic materials in seawater. Our experiments showed that bacteria living in the mature biofilm can continue to be active for several days after transfer under minimum medium with no other carbon source, as it is the case for PP, PLA, and PBS, which showed bacterial heterotrophic activities during 1 or 2 weeks before falling off. Cross-feeding of metabolites synthetized by one species to support the growth of another species to maximize utilization of available resources, together with competition to limited resources, may explain the activity observed during several days and its further decline (Pande et al., 2014; Henson and Phalak, 2017). This is an important point because such an activity could be misinterpreted as a sign of plastic biodegradation if integrative measurements were only taken at the end of the experiment. For PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV, and cellulose, the bacterial heterotrophic activity remained rather stable after 15 days in minimum medium and until the end of the experiment (94 days). Taken together with congruent results from SEM observations, we consider that the radiolabeled leucine incorporation measurement was a good proxy of their biodegradation. Our results are consistent with previous findings showing the biodegradation in soil, compost, or seawater for PBAT (Saadi et al., 2013; Weng et al., 2013; Wang et al., 2021), Mater-Bi (Kim et al., 2000), Bioplast[3], PHBV (Arcos-Hernandez et al., 2015; Deroiné et al., 2015; Wang et al., 2021), and cellulose (Salehpour et al., 2018; Kliem et al., 2020; Zambrano et al., 2020). It is interesting to note that PLA, a plastic considered to be compostable and biodegradable in soil and compost (Ren et al., 2007), did not show any sign of biodegradation under our marine experimental conditions.

[3]https://fr.biotec.de/

Identification of Putative Biodegraders of the Tested Materials

According to SEM and heterotrophic bacterial activity measurements, we focused on the OTUs selected at the end of the incubation in minimum medium on the plastic materials that showed clear signs of biodegradation under our experimental conditions: PBAT, Bioplast, Mater-Bi, PHBV, and cellulose. The presence of complex communities living under such strict conditions strongly suggest that they are putative biodegraders that may interact with one another in order to perform all or part of the degradation until the ultimate mineralization in CO_2 (Dussud and Ghiglione, 2014). We are aware that part of the identified OTUs may not be involved in the plastic degradation but rather opportunists that may survive in the biofilm (Sauret et al., 2014). Our original procedure allowed to present here a list of putative OTUs selected from a mature biofilm grown under natural seawater conditions, which may be involved in biodegradation of the plastics.

On the PBAT, we found *Thalassobius* sp. as dominant OTUs after 94 days in minimum medium with the mature biofilm and it's plastic as sole carbon source. This genus has already been suggested as potentially capable of degrading aromatic hydrocarbons in seawater (Rodrigo-Torres et al., 2017) and found in the oil polluted waters of the Gulf of Mexico (Liu et al., 2017). *Filomicrobium* sp. were also dominant at the end of the experiment and have already been observed in other marine environments (Wu et al., 2009), as well as *Prevotella* sp. and *Streptococcus* sp. known as potential pathogenic genera (Fittipaldi et al., 2012; Larsen, 2017). None of them were previously identified as potential PBAT degraders.

The bacteria growing with Mater-Bi as sole carbon source was dominated by *Filomicrobium* sp., already identified on the plastisphere of PE and PET (Muthukrishnan et al., 2018). Other groups were *Winogradskyella* sp., *Maritimibacter* sp., *Aquimarina* sp., and *Halomonas* sp., which were previously described as putative HCB (Mnif et al., 2009; Liu et al., 2017). None of them were previously identified as potential Mater-Bi (starch with PBAT) degraders.

Bacteria selected on Bioplast at the end of the experiment included *Lewinella* sp., already identified on the plastisphere of fossil-based PP, PE, and PET, as well as on biobased PHBH films (Morohoshi et al., 2018; Roager and Sonnenschein, 2019). Other potential OTUs belonging to putative HCB were *Croceitalea* sp., *Hirschia* sp., *Maribacter* sp., and *Cellulophaga* sp. None of them were previously identified as being potentially able to degrade Bioplast (starch with PLA).

Microbial communities selected after 94 days on PHBV as sole carbon source such as *Marinobacter* sp. and *Alteromonas* sp. were already known for their ability to degrade PHBV (Mergaert et al., 1995; Martinez Tobon, 2019). *Marinobacter* sp. genera contain well-known HCB capable of degrading benzene, toluene,

ethylbenzene, and xylene (BTEX) (Li et al., 2012), long-chain alkanes (Grimaud et al., 2012), polycyclic aromatic hydrocarbons (Gao et al., 2013; Cui et al., 2016), chlorinated solvents (Inoue et al., 2020), phenol (Zhou et al., 2020), and PHA (Kasuya et al., 2000; Martinez Tobon, 2019).

Finally, it is noteworthy that putative HCB were less abundant during the biodegradation phase (from 6 to 12% of the total OTUs) than during the colonization phase (from 8 to 35% of the total OTUs). These results were unexpected since several authors proposed that the HCB are certainly involved in plastic biodegradation since they are always found as dominant members of the microbial communities growing on fossil-based plastics recovered from the sea surface (Bryant et al., 2016; Pollet et al., 2018; Amaral-Zettler et al., 2020). Here, we showed that some HCB may actually be involved in biodegradation, but they were not a majority under our experimental conditions. HCB generally present a high ability to attach to particles and to live in a biofilm (Grimaud et al., 2012), two factors that may be more important than their ability to degrade plastics.

Concluding Remarks

The decisions taken by the European government to reduce the use of single-use plastics and promote biodegradable materials lead to finding substitutes for conventional plastics. Here, we emphasized that materials such as PHBV, Mater-Bi, Bioplast, PBAT, and cellulose are good alternatives to banned cotton swabs generally made of non-biodegradable PP. It is noteworthy that the bio-based polymer PLA showed no signs of biodegradation under our marine conditions, whereas the fossil-based polymer PBAT showed significant evidence of biodegradation. This reinforced the distinction that has to be made between biobased and biodegradable polymers when considering alternative to conventional fossil-based plastics.

Our approach, coupling bacterial diversity and activity measurements, brought new insights on the ability of natural biofilms to biodegrade plastic materials in seawater, with this information being essential for our understanding of the microbial communities involved in the plastisphere and for future alternative biodegradation tests of plastic items in the marine environment. Our study also opens new perspectives by identifying putative bacteria potentially capable of biodegrading the tested plastic materials. These results require further studies to better understand the still largely unexplored functional processes involved in biodegradation in natural seawater.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/ **Supplementary Material**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J-FG, JJ, and NC conceived and designed the study. NC, JJ, CG, JC, and YG carried out all the experiments and acquired the data. SB and CD provided the equipment. NC, JJ, and J-FG analyzed and interpreted the data. JJ, J-FG, NC, CG, and VB drafted the manuscript. MP-P, PC, and A-LM revised the manuscript and approved the version of the manuscript to be published. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This project was funded by the Ministry of Ecological and Solidarity Transition of the French Republic (project BIOTIGE). This work was also supported by the European project JRA-ASSEMBLE+, the French National Research Agency (project ANR-OXOMAR), the Tara Ocean Foundation (project Microplastic 2019), and the CNRS (project PEPS'I-PHABIO).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Valerie Bayo and Charlene Odobel for their kind laboratory support and to Guigui PA and VF for insightful comments on the manuscript. This work is part of the PhD thesis of JJ supported by the French Ministry of Education.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.604395/full#supplementary-material

REFERENCES

Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., and Mincer, T. J. (2020). Ecology of the plastisphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 139–151. doi: 10.1038/s41579-019-0308-0

Arcos-Hernandez, M., Montano-Herrera, L., Janarthanan, O. M., Quadri, L., Anterrieu, S., Hjort, M., et al. (2015). Value-added bioplastics from services of wastewater treatment. *Water Pract. Technol.* 10:546.

Auta, H., Emenike, C., and Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ. Inter.* 102, 165–176.

Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., and Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1985–1998. doi: 10.1098/rstb.2008.0205

Briand, E., Pringault, O., Jacquet, S., and Torreiton, J. P. (2004). The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton growth efficiency. *Limnol. Oceanogr.* 2, 406–416. doi: 10.4319/lom.2004.2.406

Bryant, J. A., Clemente, T. M., Viviani, D. A., Fong, A. A., Thomas, K. A., Kemp, P., et al. (2016). Diversity and activity of communities inhabiting plastic debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* 1 :e00024-16.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., et al. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform.* 10:421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421

Cui, Z., Gao, W., Xu, G., Luan, X., Li, Q., Yin, X., et al. (2016). Marinobacter aromaticivorans sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 353–359. doi: 10.1099/ijsem.0.000722

Dang, H., and Lovell, C. R. (2000). Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 467–475. doi: 10.1128/aem.66.2.467-475.2000

De Tender, C., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Vangeyte, J., Cattrijsse, A., et al. (2017). Temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7350–7360. doi: 10.1021/acs.est.7b00697

Debeljak, P., Pinto, M., Proietti, M., Reisser, J., Ferrari, F. F., Abbas, B., et al. (2016). Extracting DNA from ocean microplastics: a method comparison study. *Anal. Methods* 9, 1521–1523. doi: 10.1039/c6ay03119f

Deroiné, M., César, G., Le Duigou, A., Davies, P., and Bruzaud, S. (2015). Natural degradation and biodegradation of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in liquid and solid marine environments. *J. Poly. Environ.* 23, 493–505. doi: 10.1007/s10924-015-0736-5

Deroiné, M., Le Duigou, A., Corre, Y.-M., Le Gac, P. Y., Davies, P., César, G., et al. (2014a). Accelerated ageing and lifetime prediction of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in distilled water. *Poly. Test.* 39, 70–78. doi: 10.1016/j.polymertesting.2014.07.018

Deroiné, M., Le Duigou, A., Corre, Y.-M., Le Gac, P. Y., Davies, P., César, G., et al. (2014b). Accelerated ageing of polylactide in aqueous environments: comparative study between distilled water and seawater. *Poly. Degrad. Stabil.* 108, 319–329. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.01.020

Dussud, C., and Ghiglione, J.-F. (2014). "Bacterial degradation of synthetic plastics," in *Marine litter in the Mediterranean and Black Seas CIESM workshop Monographs*, ed. F. Briand (Paris: CIESM Publisher), 43–48.

Dussud, C., Hudec, C., George, M., Fabre, P., Higgs, P., Bruzaud, S., et al. (2018). Colonization of non-biodegradable and biodegradable plastics by marine microorganisms. *Front. Microbiol.* 9:1571. doi: 10.3389/fmicb.2018.01571

Eich, A., Mildenberger, T., Laforsch, C., and Weber, M. (2015). Biofilm and diatom succession on polyethylene (PE) and biodegradable plastic bags in two marine habitats: early signs of degradation in the pelagic and benthic zone? *PLoS One* 10:e0137201. doi: 10.1371/journal.pone.0137201

Elifantz, H., Horn, G., Ayon, M., Cohen, Y., and Minz, D. (2013). Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 348–357. doi: 10.1111/1574-6941.12122

Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C. et al. (2014). Plastic pollution in the World's Oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at Sea. *PLoS One* 9:e111913. doi: 10.1371/journal.pone.0111913

Erni-Cassola, G., Wright, R. J., Gibson, M. I., and Christie-Oleza, J. A. (2019). Early colonization of weathered polyethylene by distinct bacteria in marine coastal seawater. *Microbiol. Ecol.* 79, 517–526. doi: 10.1007/s00248-019-01424-5

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018). FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. doi: 10.1093/bioinformatics/btx791

Europarl (2019). *Directive (EU) 2019/904 of the European Parliament and of the Council of 5 June 2019 on the Reduction of the Impact of Certain Plastic Products on the Environment.* Available online at: https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2019/904/oj

Fegatella, F., Lim, J., Kjelleberg, S., and Cavicchioli, R. (1998). Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4433–4438. doi: 10.1128/aem.64.11.4433-4438.1998

Feng, L., He, L., Jiang, S., Chen, J., Zhou, C., Qian, Z-J., et al. (2020). Investigating the composition and distribution of microplastics surface biofilms in coral areas. *Chemosphere* 252:126565. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126565

Fittipaldi, N., Segura, M., Grenier, D., and Gottschalk, M. (2012). Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent Streptococcus suis. *Fut. Microbiol.* 7, 259–279. doi: 10.2217/fmb.11.149

Fontanella, S., Bonhomme, S., Brusson, J. M., Pitteri, S., Samuel, G., Pichon, G., et al. (2013). Comparison of biodegradability of various polypropylene films containing additives based on Mn, Mn/Fe or Co. *Polym. Degrad. Stab.* 98, 875–884. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.01.002

Fuhrman, J. A., Sleeter, T. D., Carlson, C. A., and Proctor, L. M. (1989). Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57, 207–217. doi: 10.3354/meps057207

Gao, W., Cui, Z., Li, Q., Xu, G., Jia, X., and Zheng, L. (2013). Marinobacter nanhaiticus sp. nov., polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the sediment of the South China Sea. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 485–491. doi: 10.1007/s10482-012-9830-z

Ghiglione, J.-F., Larcher, M., and Lebaron, P. (2005). Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 40, 229–240. doi: 10.3354/ame040229

Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Romig, A. D. Jr., Lyman, C. E., et al. (1992). "Sample preparation for biological, organic, polymeric, and hydrated materials," in *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, (Boston, MA: Springer). doi: 10.1007/978-1-4613-0491-3_12

Grimaud, R., Ghiglione, J.-F., Cagnon, C., Lauga, B., Vaysse, P. J., Rodriguez-Blanco, A., et al. (2012). Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *J. Bacteriol.* 194, 3539–3540. doi: 10.1128/jb.00500-12

Gutierrez, T. (2019). "Occurrence and roles of the obligate hydrocarbonoclastic bacteria in the ocean when there is no obvious hydrocarbon contamination," in *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*, ed. T. J. McGenity (Cham: Springer International Publishing).

Harrison, J. P., Boardman, C., O'Callaghan, K., Delort, A-M., and Song, J. (2018). Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review. *R. Soc. Open Sci.* 5:171792. doi: 10.1098/rsos.171792

Harrison, J. P., Schratzberger, M., Sapp, M., and Osborn, A. M. (2014). Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiol.* 14:232. doi: 10.1186/s12866-014-0232-4

Henson, M. A., and Phalak, P. (2017). Byproduct cross feeding and community stability in an in silico biofilm model of the gut microbiome. *Processes* 5:13. doi: 10.3390/pr5010013

Inoue, Y., Fukunaga, Y., Katsumata, H., Ohji, S., Hosoyama, A., Mori, K., et al. (2020). Aerobic degradation of *cis*-dichloroethene by the marine bacterium *Marinobacter salsuginis* strain 5N-3. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 66, 215–219. doi: 10.2323/jgam.2019.10.001

Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., et al. (2019). Microbial ecotoxicology of marine plastic debris: a review on colonization and biodegradation by the "plastisphere.". *Front. Microbiol.* 10:865. doi: 10.3389/fmicb.2019.00865

Kasuya, K., Mitomo, H., Nakahara, M., Akiba, A., Kudo, T., Doi, Y. (2000). Identification of a marine benthic P(3HB)-degrading bacterium isolate and characterization of its P(3HB) depolymerase. *Biomacromolecules* 1, 194–201. doi: 10.1021/bm9900186

Kliem, S., Kreutzbruck, M., and Bonten, C. (2020). Review on the biological degradation of polymers in various environments. *Materials* 13:4586.

Kim, M.-N., Lee, A.-R., Yoon, J.-S., and Chin, I.-J. (2000). Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green© and Mater-Bi© by fungi isolated from soils. *Eur. Polym. J.* 36, 1677–1685.

Kirchman, D., K'nees, E., and Hodson, R. (1985). Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 599–607. doi: 10.1128/aem.49.3.599-607.1985

Kviatkovski, I., and Minz, D. (2015). A member of the Rhodobacteraceae promotes initial biofilm formation via the secretion of extracellular factor(s). *Aquat. Microb. Ecol.* 75, 155–167. doi: 10.3354/ame01754

Lambert, S., Tragin, M., Lozano, J.-C., Ghiglione, J. F., Vaulot, D., Bouget, F. Y., et al. (2019). Rhythmicity of coastal marine picoeukaryotes, bacteria and archaea despite irregular environmental perturbations. *ISME J.* 13, 388–401.

Larsen, J. M. (2017). The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology* 151, 363–374. doi: 10.1111/imm.12760

Li, H., Zhang, Q., Wang, X.-L., Ma, X-Y., Lin, K-F., Liu, Y-D., et al. (2012). Biodegradation of benzene homologues in contaminated sediment of the East China Sea. *Bioresour. Technol.* 124, 129–136. doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.033

Liu, J., Bacosa, H. P., and Liu, Z. (2017). Potential environmental factors affecting oil-degrading bacterial populations in deep and surface waters of the Northern Gulf of Mexico. *Front. Microbiol.* 7:2131. doi: 10.3389/fmicb.2016.02131

Lobelle, D., and Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 197–200. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.10.013

Lorite, G. S., Rodrigues, C. M., de Souza, A. A., Kranz, C., Mizaikoff, B., Cotta, M. A. (2011). The role of conditioning film formation and surface chemical changes on *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm evolution. *J. Colloid Interface Sci.* 359, 289–295. doi: 10.1016/j.jcis.2011.03.066

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2:e593. doi: 10.7717/peerj.593

Maraldo, K., and Dahllöf, I. (2004). Indirect estimation of degradation time for zinc pyrithione and copper pyrithione in seawater. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 894–901. doi: 10.1016/j.marpolbul.2003.11.013

Martinez, T. (2019). *Biodegradation of Polyhydroxybutyrate by Bacterial Strains, Native Extracellular PHB Depolymerases, and Structural Variants*. Ph.D. thesis. Available online at: https://era.library.ualberta.ca/items/dbb78623-781a-4f19-a957-e08222ad5f7c

McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217

Mergaert, J., Wouters, A., Swings, J., and Anderson, C. (1995). In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. *Can. J. Microbiol.* 41, 154–159. doi: 10.1139/m95-182

Mnif, S., Chamkha, M., and Sayadi, S. (2009). Isolation and characterization of Halomonas sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. *J. Appl. Microbiol.* 107, 785–794. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04251.x

Morohoshi, T., Ogata, K., Okura, T., and Sato, S. (2018). Molecular characterization of the bacterial community in biofilms for degradation of poly(3-Hydroxybutyrate-*co*-3-Hydroxyhexanoate) films in seawater. *Microb. Environ.* 33, 19–25. doi: 10.1264/jsme2.me17052

Muthukrishnan, T., Al Khaburi, M., and Abed, R. M. M. (2018). Fouling microbial communities on plastics compared with wood and steel: are they substrate- or location-specific? *Microb. Ecol.* 78, 361–374. doi: 10.1007/s00248-018-1303-0

Oberbeckmann, S., Löder, M. G. J., and Labrenz, M. (2015). Marine microplastic-associated biofilms – a review. *Environ. Chem.* 12, 551–562. doi: 10.1071/en15069

Pande, S., Merker, H., Bohl, K., Reichelt, M., Schuster, S., De Figueiredo, L. F., et al. (2014). Fitness and stability of obligate cross-feeding interactions that emerge upon gene loss in bacteria. *ISME J.* 8, 953–962. doi: 10.1038/ismej.2013.211

Parada, A. E., Needham, D. M., and Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* 18, 1403–1414. doi: 10.1111/1462-2920.13023

Peng, C., Tang, Y., Yang, H., He, Y., Liu, Y., Liu, D., et al. (2020). Time- and compound-dependent microbial community compositions and oil hydrocarbon degrading activities in seawater near the Chinese Zhoushan Archipelago. *Mar. Pollut. Bull.* 152:110907. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.110907

Pinto, M., Langer, T. M., Hüffer, T., Hofmann, T., and Herndl, G. J. (2019). The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession. *PLoS One* 14:e0217165. doi: 10.1371/journal.pone.0217165

Pollet, T., Berdjeb, L., Garnier, C., Durrieu, G., Le Poupon, C., Misson, B., et al. (2018). Prokaryotic community successions and interactions in marine biofilms: the key role of Flavobacteriia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94.

Pulido-Villena, E., Ghiglione, J.-F., Ortega-Retuerta, E., Van-Wambeke, F., and Zohary, T. (2012). "Heterotrophic bacteria in the Pelagic Realm of the mediterranean sea," in *Life in the Mediterranean Sea: A Look at Habitat Changes*, N. Stambler (New York, NY: Nova Publishers).

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596.

Ren, J., Liu, Z., and Ren, T. (2007). Mechanical and thermal properties of poly(Lactic Acid)/starch/montmorillonite biodegradable blends. *Polym. Polym. Comp.* 15, 633–638. doi: 10.1177/096739110701500806

Roager, L., and Sonnenschein, E. C. (2019). Bacterial candidates for colonization and degradation of marine plastic debris. *Environ. Sci. Technol.* 53, 11636–11643. doi: 10.1021/acs.est.9b02212

Rodrigo-Torres, L., Pujalte, M. J., and Arahal, D. R. (2017). Draft genome sequence of *Thalassobius gelatinovorus* CECT 4357T, a roseobacter with the potential ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. *Gene Rep.* 9, 32–36. doi: 10.1016/j.genrep.2017.08.005

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584

Saadi, Z., Cesar, G., Bewa, H., and Benguigui, L. (2013). Fungal degradation of poly (Butylene Adipate-Co-Terephthalate) in soil and in compost. *J. Polym Environ.* 21, 893–901.

Salehpour, S., Jonoobi, M., Ahmadzadeh, M., Siracusa, V., Rafieian, F., and Oksman, K. (2018). Biodegradation and ecotoxicological impact of cellulose nanocomposites in municipal solid waste composting. *Int. J. Biol. Macromol.* 111, 264–270.

Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R., and Briand, J. F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 15, 2879–2893.

Sashiwa, H., Fukuda, R., Okura, T., Sato, S., and Nakayama, A. (2018). Microbial degradation behavior in seawater of polyester blends containing poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx). *Mar. Drugs* 16:34. doi: 10.3390/md16010034

Sauret, C., Séverin, T., Vétion, G., Guigue, C., Goutx, M., Pujo-Pay, M., et al. (2014). 'Rare biosphere' bacteria as key phenanthrene degraders in coastal seawaters. *Environ. Pollut.* 194, 246–253. doi: 10.1016/j.envpol.2014.07.024

Sauret, C., Tedetti, M., Guigue, C., Dumas, C., Lami, R., Pujo-Pay, M., et al. (2016). Influence of PAHs among other coastal environmental variables on total and PAH-degrading bacterial communities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4242–4256.

Science Advice for Policy by European Academies [SAPEA] (2020). *Biodegradability of Plastics in the Open Environment*, Vol. 10. Berlin: Science Advice for Policy by European Academies, 26356.

Silva Dutra, L., da Souza Belan Costa, T., de Lobo, V. T. V., et al. (2019). Preparation of polymer microparticles through non-aqueous suspension polycondensations: part III—degradation of PBS microparticles in different aqueous environments. *J. Polym. Environ.* 27, 176–188. doi: 10.1007/s10924-018-1329-x

Simon, M., and Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51, 201–213. doi: 10.3354/meps051201

UNEP (2018). *Legal Limits on Single-Use Plastics and Microplastics : A Global Reviews of National Laws and Regulations*. Available online at: https://www.unep.org/resources/report/legal-limits-single-use-plastics-and-microplastics (accessed December 6, 2018).

Vila-Costa, M., Sebastián, M., Pizarro, M., Cerro-Gálvez, E., Lundin, D., Gasol, J. M., et al. (2019). Microbial consumption of organophosphate esters in seawater under phosphorus limited conditions. *Sci. Rep.* 9:233.

Wang, G.-X., Huang, D., Ji, J.-H., Völker, C., and Wurm, F. R. (2021). Seawater-degradable polymers-fighting the marine plastic pollution. *Adv. Sci.* 8:2001121.

Wang, W., Gao, H., Jin, S., Li, R., and Na, G. (2019). The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 173, 110–117. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.113

Ward, J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Statist. Assoc.* 58, 236–244. doi: 10.1080/01621459.1963.10500845

Webb, H., Arnott, J., Crawford, R., and Ivanova, E. (2012). Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). *Polymers* 5, 1–18. doi: 10.3390/polym5010001

Weng, Y.-X., Jin, Y.-J., Meng, Q.-Y., Wang, L., Zhang, M., and Wang, Y.-Z. (2013). Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polym. Test.* 32, 918–926.

Wu, X.-L., Yu, S.-L., Gu, J., Zhao, G. F., and Chi, C. Q. (2009). *Filomicrobium insigne* sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 59, 300–305. doi: 10.1099/ijs.0.65758-0

Zambrano, M. C., Pawlak, J. J., Daystar, J., Ankeny, M., Goller, C. C., Venditti, R. A., et al. (2020). Aerobic biodegradation in freshwater and marine environments of textile microfibers generated in clothes laundering: effects of cellulose and polyester-based microfibers on the microbiome. *Mar. Pollut. Bull.* 151:1108.

Zettler, E. R., Mincer, T. J., and Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the "Plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146. doi: 10.1021/es401288x

Zhou, M., Dong, B., and Shao, Z. (2020). Complete genome sequence of Marinobacter sp. LQ44, a haloalkaliphilic phenol-degrading bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Mar. Genomics* 50:100697. doi: 10.1016/j.margen.2019.100697

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Jacquin, Callac, Cheng, Giraud, Gorand, Denoual, Pujo-Pay, Conan, Meistertzheim, Barbe, Bruzaud and Ghiglione. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.