



Muséum
national
d'Histoire
naturelle

PROPOSITION DE STAGE

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

Responsables : Dr. Fabien JOUX (UPMC) / Pr. Cécile BERNARD (MNHN)

Les propositions de stage sont à renvoyer par e-mail aux adresses suivantes :

Fabien Joux : joux@obs-banyuls.fr
Cécile Bernard : cbernard@mnhn.fr

1. Laboratoires:

Muséum National d'Histoire Naturelle
UMR 7245 CNRS-MNHN Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes
Eq. Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement
12, rue Buffon – CP39
75231 PARIS Cedex 05

Responsable de l'encadrement :

Prof. Cécile BERNARD
Muséum National d'Histoire Naturelle
UMR 7245 CNRS-MNHN Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes
Eq. Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement
12, rue Buffon – CP39
75231 PARIS Cedex 05
Tel : + 33 (0)1 40 79 31 83 ou 31 95
cbernard@mnhn.fr

Co-encadrement :

Dr. Marc Troussellier & Patrice Got
UMR 9190 CNRS – UM2 - IRD - IFREMER, Marine Biodiversity Exploitation and Conservation,
UNIVERSITE DE MONTPELLIER,
CC 093 - bat 24,
Place Eugène Bataillon,
34 095 MONTPELLIER Cedex 5

Dr. Hélène Agogué
CNRS – Université de la Rochelle
UMR 7266 LIENSs
Institut du Littoral et de l'Environnement
2, Rue Olympe de Gouges
17000 La Rochelle

2. Titre du stage : Diversité des espèces rares du phytoplancton du lac Dziani (Mayotte) :

L'écosystème du lac de cratère Dziani Dzaha, sur l'île de Petite Terre à Mayotte, possède de nombreuses caractéristiques semblables à celles des lacs alcalins salés ou «soda lake» (e.g. Chakkiath et al. 2013). Ces lacs alcalins salés sont peuplés de microorganismes tolérants de fortes salinité généralement des archées, des bactéries, des cyanobactéries filamenteuses appartenant aux Oscillatoriales (e.g. *Arthrospira* sp.) ou encore des cyanobactéries de petites tailles, les picocyanobactéries (e.g. *Synechococcus* sp., Keresztes et al. 2012 ; *Cyanobium* sp., Somogyi et al. 2010). Les bactéries de ces lacs sont généralement hétérotrophes, et ou spécialisées dans la méthylothrophie ou la méthanotrophie (Chakkiath et al. 2013). Ces lacs sont considérés comme des environnements extrêmes, avec une diversité et une abondance de microorganismes procaryotes plus importantes que celles des eucaryotes (Lewin et al. 2000 ; Krienitz et al. 2012).

La lac Dziani comprend des biomasses phytoplanctoniques équivalentes à celles obtenues dans les cultures artificielles les plus denses (concentration en chlorophylle a comprise entre 600 à 800 µg/L). Les particularités biogéochimiques de cet écosystème ont conduit à mettre en place deux programmes de recherche (ANR Dziani, porteur M. Ader et Fondation Total Dzaha, porteur C. Leboulanger). Parmi les différents axes de recherche de ces programmes, l'étude de la diversité du phytoplancton du lac est un enjeu majeur pour mieux comprendre le fonctionnement du lac Dziani.

Concernant la diversité du phytoplancton de ce lac, l'approche microscopique a permis de recenser les producteurs primaires dominants, des cyanobactéries filamenteuses appartenant aux Oscillatoriales, de la famille des Microcoleaceae (Drelin Y. 2015). D'autres genres de cyanobactéries ont été identifiés : *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *Desertifilum* et *Spirulina* (Drelin Y. 2015).

Des taxa de phytoplancton sont également présents sous forme unicellulaires, d'une taille < 3 µm, suspectés comme étant du picophytoplancton (Peiffer R. 2015). Des travaux préliminaires utilisant la cytométrie en flux (CMF) ont montré que plusieurs populations de pico-et nanophytoplancton coexistent dans la colonne d'eau du lac Dziani, avec des niveaux d'abondance très différents et très variables suivant les conditions environnementales. En effet, le lac Dziani présente en effet une très forte stratification verticale en termes de pH, d'oxygène, de salinité et d'H₂S qui génère en quelques mètres des niches écologiques très contrastées.

Ces populations de picophytoplancton restent très mal connues. De plus, à ce jour, seule une souche de *Picocystis* (picoeucaryote) a pu être isolée et mise en culture. Une des raisons pour lesquelles certaines populations de picophytoplancton n'ont pu être caractérisées ou isolées tient en leur très faible abondance. De plus, des travaux récents dédiés à la diversité des microorganismes utilisant les nouvelles techniques de séquençage ont révélé qu'un grand nombre d'entités taxonomiques étaient présentes dans les écosystèmes aquatiques sous forme de populations rares, c'est à dire comportant un tout petit nombre d'individus. C'est le cas pour de nombreux taxa et notamment pour les cyanobactéries dans les lacs alcalins salés du rift éthiopien (Lanzen et al. 2013). Pour autant, ces populations de microorganismes rares ne sont pas inactives et peuvent devenir plus abondantes dans certaines conditions (Alonso-Saez et al. 2015). La contribution de ce compartiment a probablement un rôle sous-estimé dans les flux de matière soutenant les niveaux trophiques supérieurs.

Dans le contexte du lac Dziani, le stage de Master 2 aura pour objectifs :

- d'analyser la diversité des populations rares par une approche globale de séquençage de l'ADN environnemental du phytoplancton (pro- et eucaryotes) et ce sur un transect vertical du lac (0 - 18 m)
- d'isoler et de mettre en culture des populations phytoplanctoniques du lac pouvant être caractérisés comme « rares » par comparaison avec les données de génomique environnementale

Les approches utilisées seront les suivantes :

- Application des méthodes de séquençage massif afin d'apporter des informations sur la composition phylogénétique. L'objectif est, en particulier, de comparer la diversité taxonomique obtenue par dénombrement classique (microscopie) et par séquençage sur amplicons d'ADN.

Pour évaluer la diversité totale des cyanobactéries dans la colonne d'eau et son éventuelle

modification en fonction de la stratification verticale, des prélèvements d'eau en zones oxygène et anoxique et à l'interface eau-sédiment) ont été filtrés sur membrane de 3 µm et 0,2 µm de porosité. Une extraction d'ADN a été réalisée sur chaque échantillon puis une amplification de la région de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S a été effectuée à l'aide d'amorces spécifiques aux taxa photosynthétiques.

La technique de pyroséquençage à haut débit MiSeq (Pedros - Alió 2012) sera utilisée. Le pyroséquençage sera réalisé en sous-traitance par des séquenceurs de deuxième génération par la technologie Illumina.

Les séquences du gène ribosomique 16S obtenues par ailleurs sur les souches isolées du lac (Drelin Y. 2015) permettront une meilleure résolution des liens phylogénétiques et une assignation taxinomique sûre des séquences obtenues par pyroséquençage.

- Détection, tri cellulaire en CMF et caractérisation des populations rares de phytoplancton du lac Dziani après mise en culture :

Des tests préalables seront réalisés à partir de cultures de picophytoplancton mélangées selon des proportions connues pour simuler la coexistence de populations rares et abondantes. L'analyse de ces mélanges permettra de définir les seuils et les conditions de détection et de tri des populations rares.

Les populations des échantillons du milieu naturel, dont les abondances sont les plus faibles mais détectables seront triées sur un cytomètre FACSARIA. Chaque population triée sera mise en culture dans différentes conditions. Un premier type de milieu de culture utilisera de l'eau du lac Dziani préalablement filtrée pour éliminer les populations de microorganismes. Cet environnement de culture de base sera complété par l'addition de différents sels nutritifs (N, P). Un deuxième type de milieu de culture sera constitué à partir de celui défini par Budinoff & Hollibaugh (2007) utilisé pour isoler une souche de picocyanobactérie d'un lac hypersalin. Les essais de mise en culture seront réalisés selon un plan d'expérience croisant la nature et la concentration en nutriments. Les essais de culture seront réalisés dans des conditions de lumière et de température identiques à celles mesurées in situ.

Les cultures positives seront ensuite caractérisées en microscopie électronique (HT7700, Plateforme de Microscopie Electronique du MNHN) et par analyses phylogénétiques à partir de l'ADNr 16S.

Le stage se déroulera sur plusieurs lieux géographiques; une mobilité géographique est requise. Une connaissance en microbiologie ou biologie moléculaire est souhaitée mais pas obligatoire.

Références bibliographiques :

- Budinoff, C. R., & Hollibaugh, J. T. 2007. Ecophysiology of a Mono Lake picocyanobacterium. *Limnology and Oceanography*, 52(6) : 2484-2496.
- Chakkiath P. A., Deepak K., Sindy H., Harold L D., Colin M., Yogesh S. 2013. Microbiology of Lonar Lake and other soda lakes. *The ISME Journal* 7, 468-476.
- Lewin R.A., Krienitz L., Goericke R., Takeda H., Hepperle D. 2000. *Picocystis salinarum* gen. et sp. nov. (Chlorophyta) – a new picoplanktonic green alga. *Phycologia* 39(6): 560-565.
- Keresztes, Z. G., Felföldi, T., Somogyi, B., Székely, G., Dragoş, N., Márialigeti, K., ... & Vörös, L. 2012. First record of picophytoplankton diversity in Central European hypersaline lakes. *Extremophiles*, 16(5), 759-769.
- Krienitz L., Bock C., Kotut K., Luo W. 2012. *Picocystis salinarum* (Chlorophyta) in saline lakes and hot springs of East Africa. *Phycologia* 51(1): 22-32.
- Drelin Y. 2015. Rôle des cyanobactéries dans le cycle de l'azote du lac Dziani. Mémoire de Master 2 du Muséum National d'Histoire Naturelle. Peiffer R., 2015
- Pedros-Alió C (2012) The rare bacterial biosphere. *Ann Rev Mar Sci* 4: 449-466
- Somogyi, B., Felföldi, T., Dinka, M., & Vörös, L. 2010. Periodic picophytoplankton predominance in a large, shallow alkaline lake (Lake Fertő, Neusiedlersee). *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* . 46 : 9-19.

3. Publications significatives du laboratoire d'accueil :

C. Bernard, MNHN MCAM :

- Catherine A., Mouillot D., Maloufi S., Yéprémian C., Troussellier M., Bernard C. 2013. Eutrophication scenarios applied to periurban lakes : forecasting the impact of future Policy planning. *Plos One* 01/2013; 8(8):e72227.

- Tran T. D C., Bernard C., Ammar M., Chaouch S., Comté K. 2013. Expression of genes encoding heat shock proteins in a MC-producing cyanobacterium (*Planktothrix agardhii*) and its MC-deficient mutant under high light condition. *Plos One*. 8(9), e73198.
- Alvarenga L. M., Muzard J., Ledreux A., Bernard C., Billiald P. 2014. Colorimetric engineered immunoprobe for the detection and quantification of microcystins. *Journal of Immunological Methods*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2014.02.014>.
- Escoffier N., Bernard C., Hamlaoui S., Groleau A., Catherine A. 2014. Quantifying phytoplankton communities using spectral fluorescence: The effect of species composition and physiological state
- Tran T. D C., Bernard C., Comte K. 2014. Cloning of some heat shock proteins genes for further transcriptional study of *Planktothrix agardhii* exposed to abiotic stress. *Folia microbiologica*. DOI: 10.1007/s12223-014-0372-9.

H. Agogué, CNRS LiENSs :

- Hugoni, M., Agogué, H., Taib, N., Domaizon, I., Moné, A., Galand, P., Bronner, G., Debroas, D., Mary, I. (2015) Temporal Dynamics of Active Prokaryotic Nitrifiers and Archaeal Communities from River to Sea. *Microbial Ecology* 70, 473-483.
- Agogué, H., Mallet, C., Orvain, F., De Crignis, M., Mornet, F., Dupuy, C., 2014. Bacterial dynamics in a microphytobenthic biofilm: A tidal mesocosm approach. *Journal of Sea Research*. 92, 36-45.
- Lavergne, C., Beauguard, L., Dupuy, C., Courties, C., Agogué, H. 2014. An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* 105, 31-38.
- Agogué, H., Lamy, D., Neal, P.R., Sogin, M.L., Herndl, G.J. 2011. Water mass-specificity of bacterial communities in the North Atlantic revealed by massively parallel sequencing. *Molecular Ecology* 20, 258-274.
- Agogué, H., Brink, M., Dinasquet, J., Herndl, G.J., 2008. Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. *Nature* 456, 788-792.

M. Troussellier, CNRS MARBECH:

- Escalas A., Bouvier T., Mouchet M.A., Leprieur F., Bouvier C., Troussellier M., Mouillot D. 2013. A unifying quantitative framework for exploring the multiple facets of microbial biodiversity across diverse scales. *Environ. Microbiol.* 15 : 2642-2657.
- Catherine A., Mouillot D., Maloufi S., Troussellier M., Bernard C. 2013. Projected phytoplankton biomass of periurban lakes in response to future regional land management policies. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0072227.
- Guilhaumon F., Albouy C., Claudet J., Velez L., Ben Rias Lasram F., Tomasini J-A., Douzery E. J. P., Meynard C., Mouquet N., Troussellier M., Araujo M. B., Mouillot D. 2014. Representing taxonomic, phylogenetic and functional diversity : new challenges for Mediterranean marine-protected areas. *Diversity Distrib.* DOI : 10.1111/ddi.12280.
- Albouy C., Ben Rais Lasram F., Velez L., Guilhaumon F., Meynard C.N., Boyer S., Benestan L., Mouquet N., Douzery E., Aznard R., Troussellier M., Somot S., Leprieur F., Le Loc'h F. , Mouillot D. 2015. FishMed: traits, phylogeny, current and projected species distribution of Mediterranean fishes and environmental data. *Ecology*, in press.
- Mostajir B., Roques C., Bouvier C., Bouvier T., Fouilland E., Got P., Le Floc'h E., Nougier J., Mas S., Sempéré R., Sime-Ngando T., Troussellier M. , Vidussi F. 2015 Microbial food web structural and functional responses to oyster and fish as top predators. *Marine Ecology Progress Series*, in press.