



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
UMR 7245 CNRS-MNHN Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes
12, rue Buffon – CP39
75231 PARIS Cedex 05
cbernard@mnhn.fr

Co-encadrement :

Dr. Marc Troussellier
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

Dr Mylène Hugoni
Université Claude Bernard Lyon 1
UMR5557 Ecologie Microbienne
43 Bd du 11 Novembre 1918
69622 VILLEURBANNE Cedex

2. Titre du stage : Diversité des microorganismes photosynthétiques du lac Dziani (Mayotte) par métagénomique

Le lac Dziani, formé dans le cratère d'un ancien volcan sur l'île de Petite Terre de Mayotte, a été récemment identifié comme un analogue probable des océans précambriens. Cette analogie est basée sur des résultats montrant une anoxie permanente en profondeur, une population essentiellement composée de procaryotes (phototrophes et hétérotrophes) avec un $\Delta^{13}\text{C}$ proche de +13‰. Une des caractéristiques de ce lac est qu'il abrite une importante biomasse phytoplanctonique principalement composée de cyanobactéries filamenteuses, appartenant au genre *Arthrospira*. Les caractéristiques environnementales de cet écosystème sont donc semblables à celles des lacs alcalins salés ou «soda lake» (e.g. Chakkiath et al., 2013).

En terme de diversité biologique, ces lacs alcalins salés sont peuplés de microorganismes tolérants à de fortes salinité (e.g. archées, bactéries, cyanobactéries filamenteuses ou encore picoeucaryotes (Somogyi et al. 2010)). Ces lacs sont considérés comme des environnements extrêmes, avec une diversité de microorganismes procaryotes plus importante que celle des eucaryotes (Lewin et al., 2000 ; Krienitz et al., 2012).

Les particularités biogéochimiques du lac Dziani sont étudiées dans le cadre de deux programmes de recherche (ANR Dziani et Fondation Total Dzaha). Parmi les différents axes de recherche de ces programmes, l'étude de la diversité des microorganismes photosynthétiques du lac est un enjeu majeur pour mieux comprendre son fonctionnement (e.g. cycles de l'azote et du carbone).

Concernant la diversité du phytoplancton de ce lac, l'approche microscopique a permis de recenser les principaux types de producteurs primaires : i) des cyanobactéries filamenteuses abondantes du genre *Arthrospira*, ii) des cyanobactéries filamenteuses peu abondantes appartenant aux genres *Leptolyngbya*, *Haloleptolyngbya*, *Desertifilum* et *Spirulina* (Drelin Y., 2015) et iii) des picoeucaryotes unicellulaires, d'une taille < 3 μm , appartenant à l'espèce *Picocystis salinarum* (Peiffer R., 2015). Plus de 70 souches de ces espèces ont été isolées du lac Dziani et sont maintenues dans les collections du MNHN. Cependant, cette vision de la diversité des communautés phytoplanctoniques est limitée aux espèces les plus abondantes et à celles qui ont pu se développer dans des conditions de cultures traditionnelles.

L'utilisation de techniques de séquençage à haut débit (NGS) autorisant des profondeurs d'échantillonnage bien plus importantes que les techniques microscopiques devrait permettre (i) de dresser un profil exhaustif de la composition taxonomique des communautés de microorganismes du lac Dziani, (ii) d'estimer les diversités taxonomique, fonctionnelle de ces communautés et (iii) d'analyser leurs relations avec les variables environnementales spécifiques de ce lac. La profondeur de séquençage permet également de détecter les taxons les plus rares. En effet, les récentes avancées moléculaires, et notamment l'essor des techniques de séquençage ont permis de mettre en évidence une quantité de microorganismes rares bien plus importante que présumé (e.g. Szabo et al. 2007; Elshahed et al. 2008; Youssef et al. 2010; Vergin et al. 2013). De plus, il a été montré que ces microorganismes rares, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes peuvent être actifs (Campbell et al., 2011 PNAS, Hugoni et al 2013., PNAS, Debros et al., 2015 Mol Ecol). Ces nombreux taxons rares constitueraient ainsi une réserve de biodiversité essentielle au bon fonctionnement des écosystèmes permettant de faire face à des environnements changeants et/ou extrêmes.

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

- d'analyser les diversités taxinomique et fonctionnelle des populations microbiennes photosynthétiques (diversité α , β et γ) retrouvées à des saisons contrastées, permettant d'avoir accès à la dynamique temporelle des communautés et enfin, d'étudier plus précisément la structure des communautés photosynthétiques rares.

L'approche méthodologique utilisée sera celle d'une approche de métabarcoding (séquençage d'amplicons d'ADNr 16S) conduite à partir de quatre campagnes d'échantillonnage (deux en période

des pluies DZ14-04 et DZ15-04¹) et deux en période sèche (DZ14-10 et DZ15-11²). Sept profondeurs ont été sélectionnées sur un transect vertical du lac (0 - 18 m). Ces profondeurs correspondent à des conditions environnementales très contrastées notamment en termes de lumière, de potentiel d'oxydo-réduction, de concentrations en oxygène dissous et en hydrogène sulfuré.

Les séquences ont d'ores et déjà été obtenues par Illumina HiSeq2500 / HiSeq Rapid Run 300bp paired-end (coll. M. Hugoni, Univ. Lyon 1 & H. Agogué, Univ. De La Rochelle). La région hypervariable V3-V5 du gène de l'ARNr 16S chez les bactéries a été ciblée et des amplicons d'environ 500 paires de bases ont été obtenus (118 millions de séquences environ). Les étapes d'assemblage, nettoyage, clusterisation et assignation taxonomique des séquences sont en cours. Des outils de bioinformatique spécifiques seront également mis en œuvre pour prédire les profils fonctionnels des communautés à partir des séquences d'ARNr 16S (e.g., PICRUST, Langille et al. 2013 ; Tax4FUN, Aßhauer et al. 2015).

Pour répondre aux questions posées dans le cadre de ce stage de Master 2, les séquences obtenues par métabarcoding seront analysées selon les étapes suivantes :

- Analyse de la diversité taxonomique et fonctionnelle des populations microbiennes photosynthétiques (diversité α , β et γ)

La composition et la structure taxinomique de la communauté des microorganismes photosynthétiques sera analysée aux sept profondeurs et aux quatre campagnes. La diversité « locale » de la communauté à chaque profondeur sera calculée (diversité α) et comparée à celle de la diversité globale du lac (diversité γ). La variabilité de la composition en taxa des communautés des différentes profondeurs (diversité β) sera également estimée.

La diversité fonctionnelle sera évaluée selon les groupes taxinomiques caractérisés. Les indices de diversité fonctionnelle seront étudiés par les mêmes approches que ceux de la diversité taxinomique.

- Analyse des relations diversité taxinomique en relation avec les facteurs environnementaux

Les relations entre la composition des communautés microbiennes photosynthétiques et les variables environnementales seront étudiées par des analyses statistiques. Une base de données environnementale est actuellement disponible, comprenant plus de 40 variables (physique, chimique ou biologique) pour chaque campagne et chaque profondeur.

- Analyse des populations rares et de leur dynamique

Les taxa les plus rares seront identifiés à chaque profondeur d'échantillonnage. Leur identité taxinomique et leurs caractéristiques fonctionnelles inférées seront comparées à celles des taxa dominants. Leur effectif sera estimé aux autres profondeurs pour apprécier leur éventuelle dynamique et, dans le cas où il se modifierait de façon significative, il sera possible de définir les conditions environnementales impliquées dans cette dynamique.

Références bibliographiques :

- Aßhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R., & Meinicke, P. (2015). Tax4Fun- predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31(17), 2882-2884
- Alonso-Sáez, L., Zeder, M., Harding, T., Pernthaler, J., Lovejoy, C., Bertilsson, S. & Pedrós-Alió, C. (2014) Winter bloom of a rare betaproteobacterium in the Arctic Ocean. *Frontiers in microbiology* 5, 425.
- 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.
- 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.

- Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Spain, A.M., Sheik, C., Najjar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Roe, B. a., Davis, J.P., Schloss, P.D., Bailey, V.L. & Krumholz, L.R. (2008) Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 5422–5428.
- Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., ... & Beiko, R. G. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, 31(9), 814-821
- Pedró-s-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.
- Szabo, K.E., Itor, P.O.B., Bertilsson, S., Tranvik, L. & Eiler, A. (2007) Importance of rare and abundant populations for the structure and functional potential of freshwater bacterial communities. *Aquatic Microbial Ecology* 47, 1–10. Journal Article, .
- Vergin, K., Done, B., Carlson, C. & Giovannoni, S. (2013) Spatiotemporal distributions of rare bacterioplankton populations indicate adaptive strategies in the oligotrophic ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 71, 1–13.
- Youssef, N.H., Couger, M.B. & Elshahed, M.S. (2010) Fine-scale bacterial beta diversity within a complex ecosystem (Zodletone Spring, OK, USA): the role of the rare biosphere. *PLoS One* 5, e12414.

3. Publications significatives des encadrants :

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.
- 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.
- Zhang, X., Agogué, H., Dupuy, C., Gong, J., 2014. Relative Abundance of Ammonia Oxidizers, Denitrifiers, and Anammox Bacteria in Sediments of Hyper-nutriented Estuarine Tidal Flats and in Relation to Environmental Conditions. *CLEAN – Soil, Air, Water* 42, 815-823.
- 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.

M. Troussellier, CNRS MARBEC:

- 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.
- Mostajir B., Roques C., Bouvier C., Bouvier T., Fouilland E., Got P., Le Floch 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.

M. Hugoni, Université Claude Bernard

- 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.
- Hugoni, M., Taib, N., Debroas, D., Domaizon, I., Dufournel, I.J., Bronner, G., Salter, I., Agogué, H., Mary, I., Galand, P.E.,** 2013. Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 6004-6009.