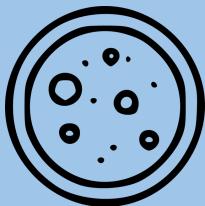


Je suis un microbe dans le lac, me voyez-vous ?

Écologie microbienne aquatique



Présenté par
Naíla Barbosa da Costa, Paula Reis et Patricia Tran

Les Ateliers Automnaux GRIL-EcoLac 2017



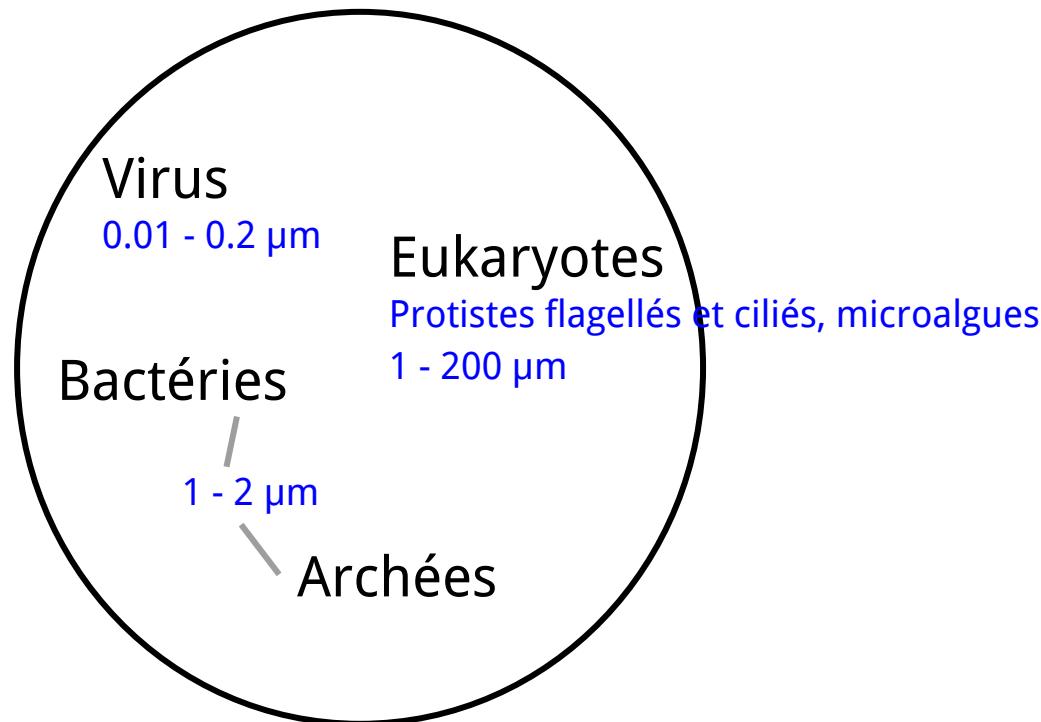
Groupe de recherche
interuniversitaire en limnologie
et en environnement aquatique



Programme de formation FONCER du
CRSNG en écologie lacustre et fluviale

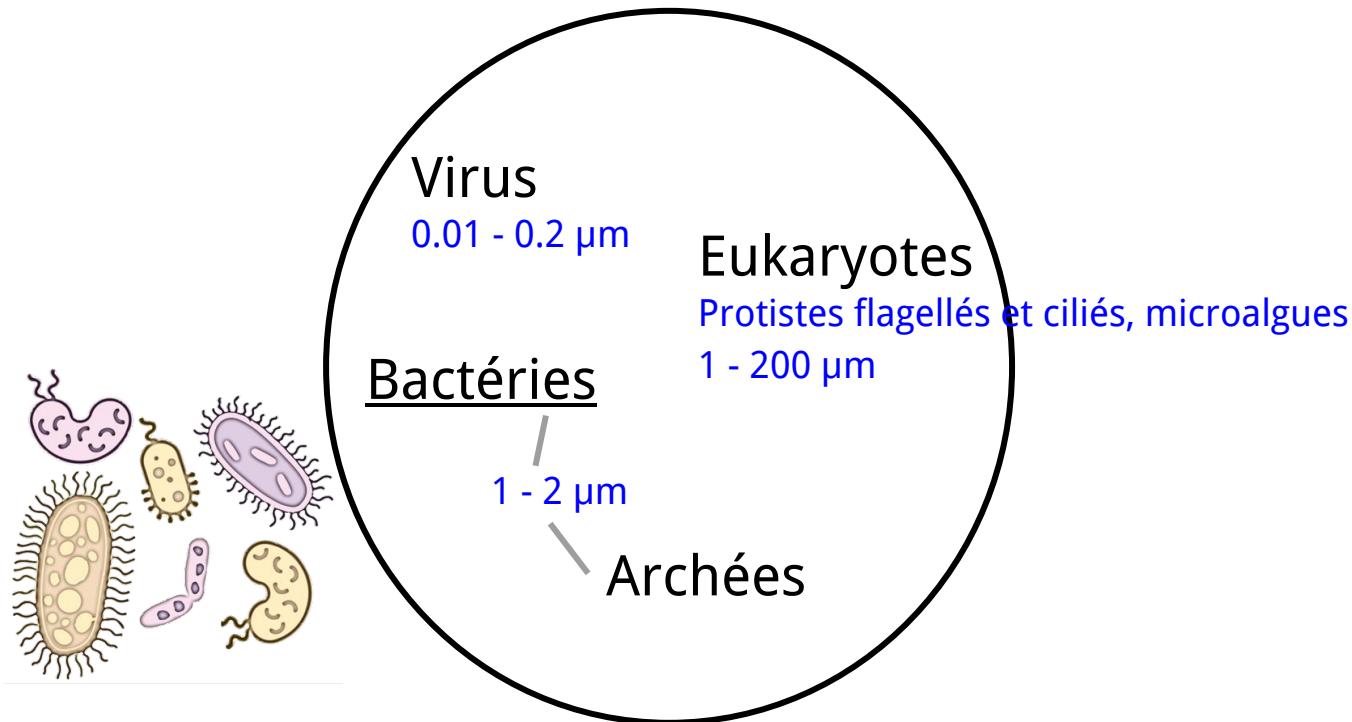
Qu'est-ce qu'un microbe ?

Microbe: organisme microscopique



Qu'est-ce qu'un microbe ?

Microbe: organisme microscopique



Outline

Intro à l'écologie microbienne

Focus sur les bactéries dans les lacs:

Que font-elles ?

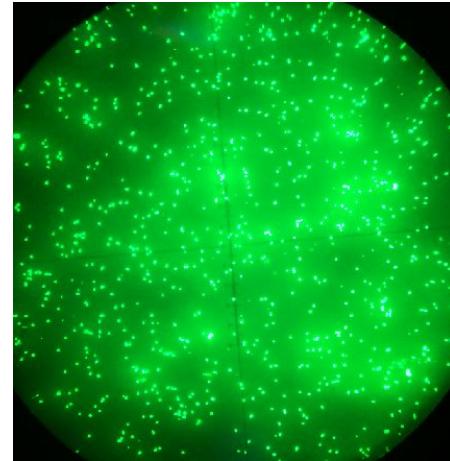
- Diversité de métabolismes

Sont-elles actives ?

- Déetecter leur activité

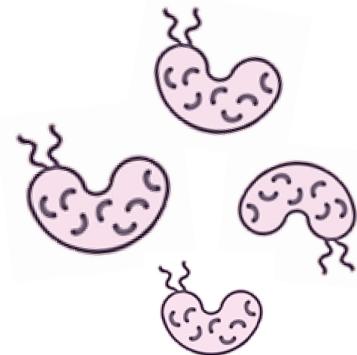
Les identifier (qui sont-elles ?)

- Méthodes de culture
- Méthodes traditionnelles
- Méthodes NGS ("next-generation sequencing")

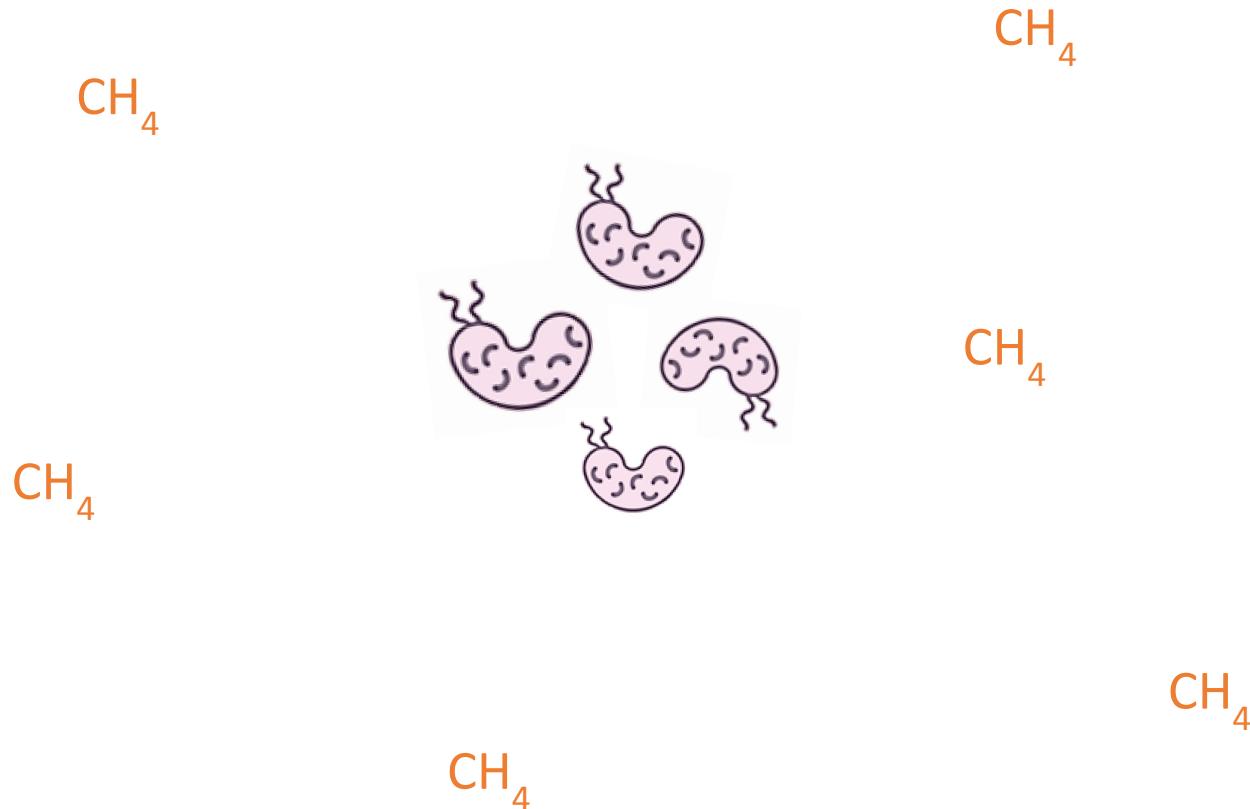


Belles bactéries méthanotrophes

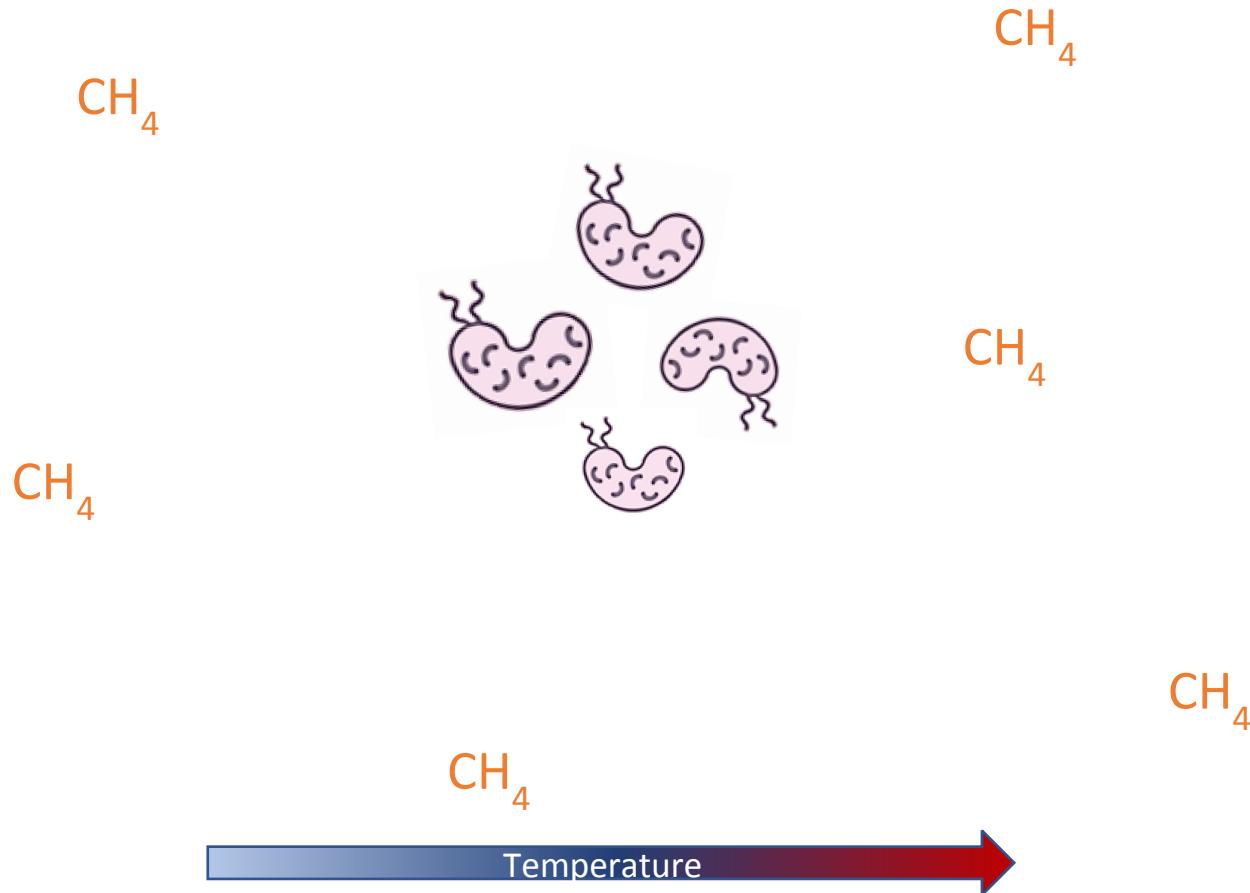
Différents régulateurs d'abondances bactériennes



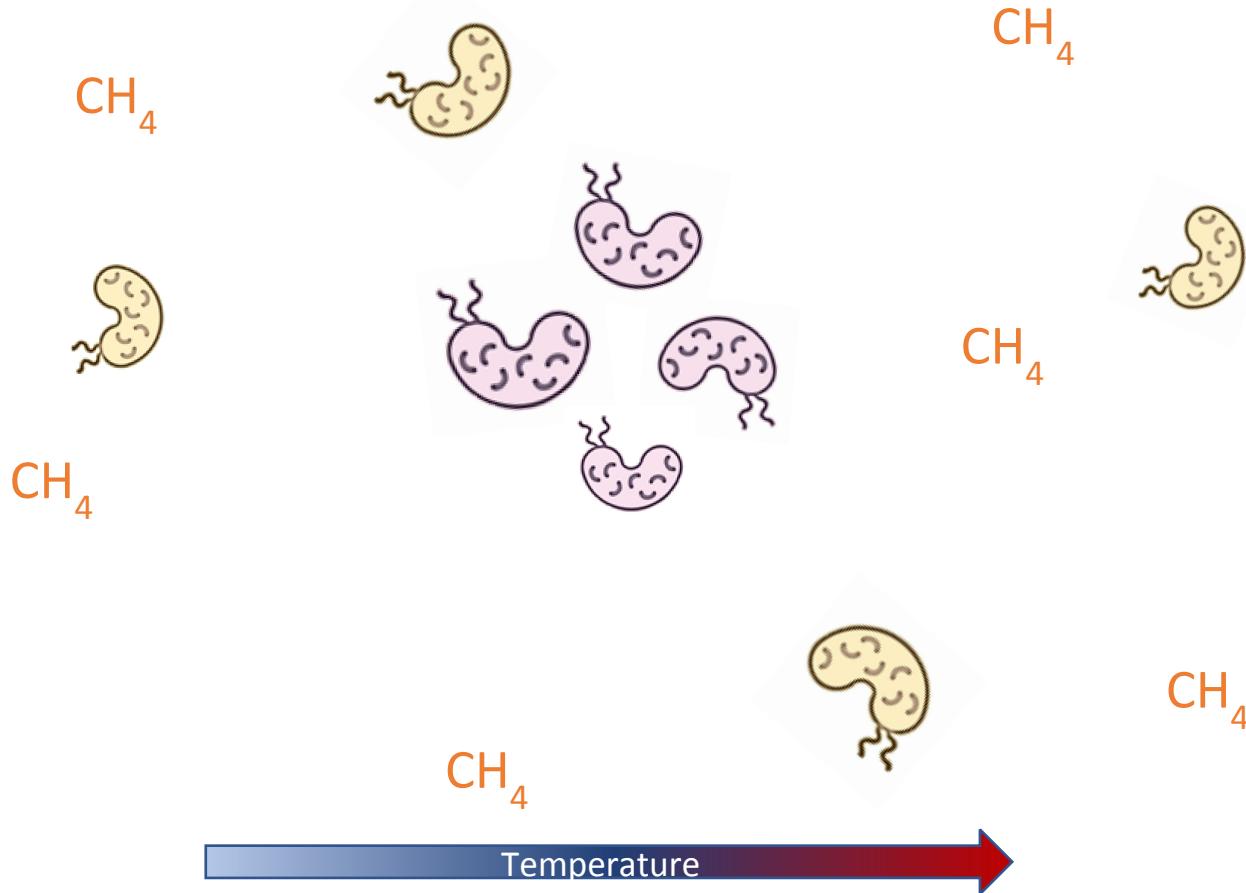
Différents régulateurs d'abondances bactériennes



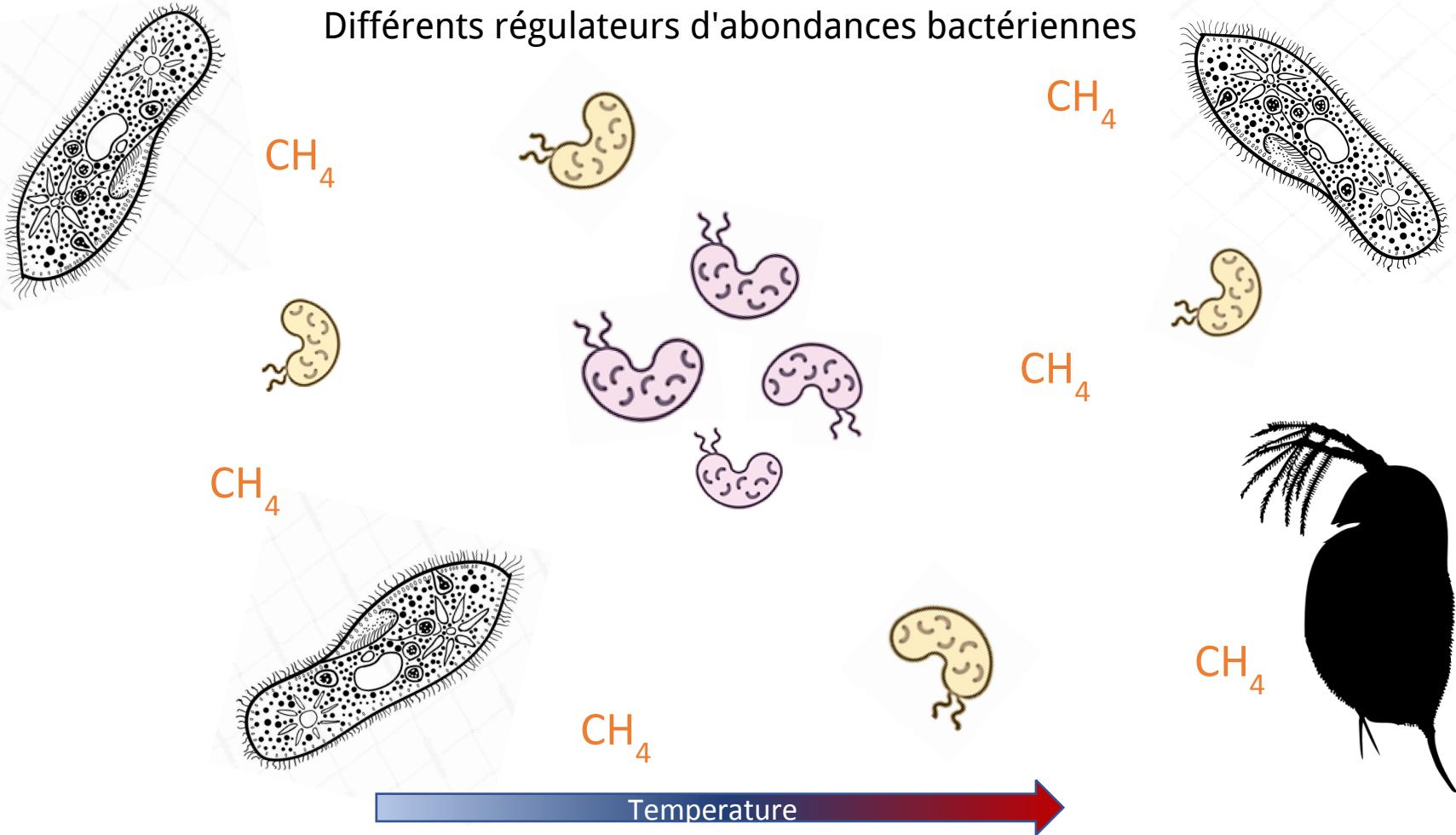
Différents régulateurs d'abondances bactériennes



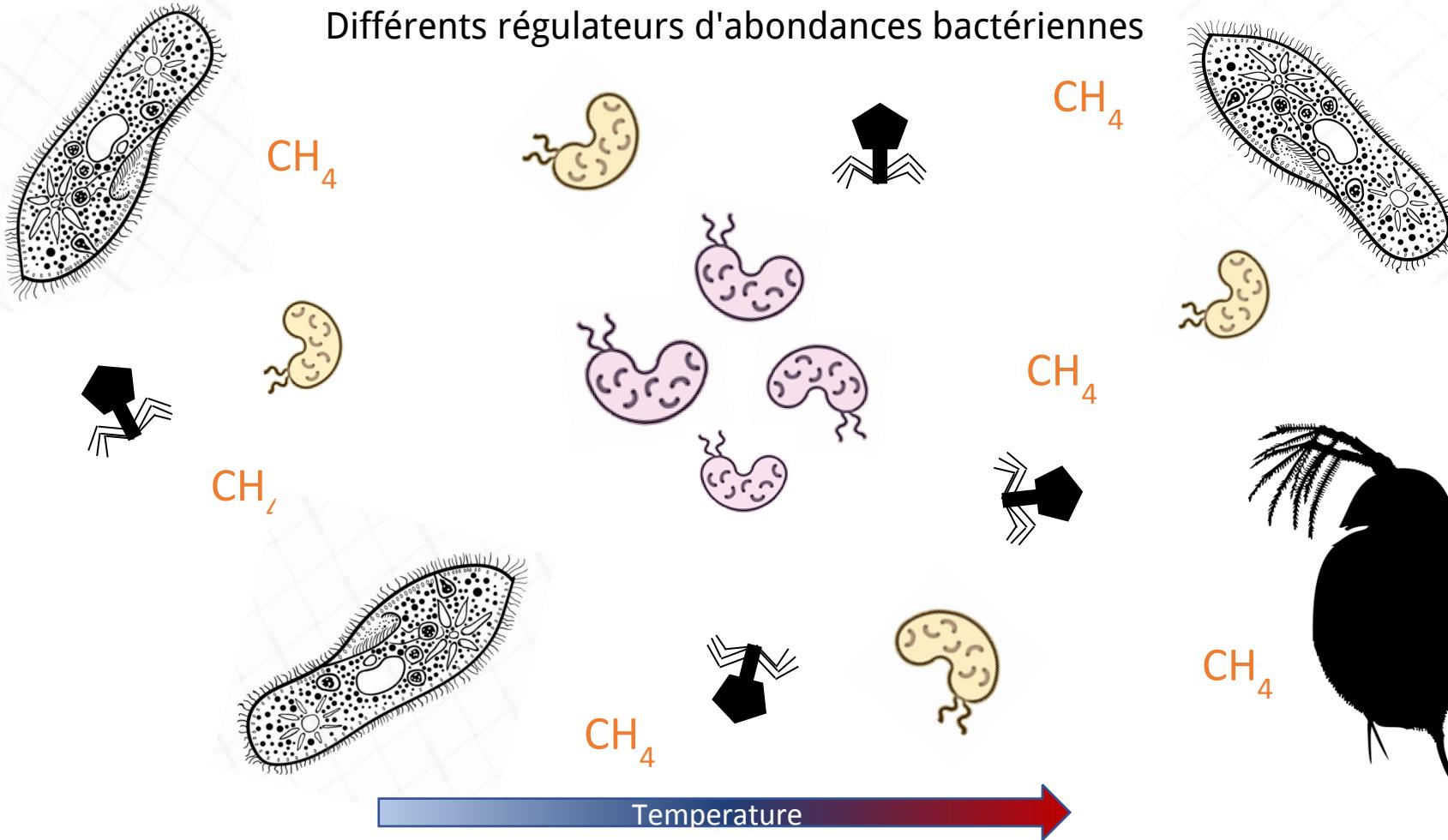
Différents régulateurs d'abondances bactériennes



Différents régulateurs d'abondances bactériennes



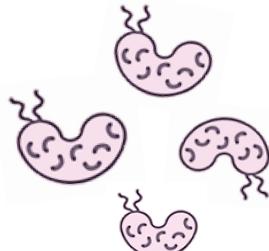
Différents régulateurs d'abondances bactériennes



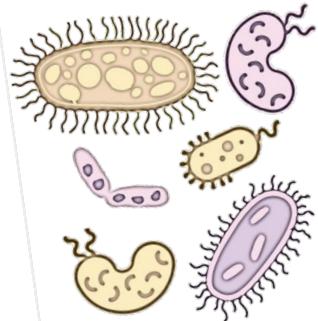


Les échelles

Génomique



Population



Communauté



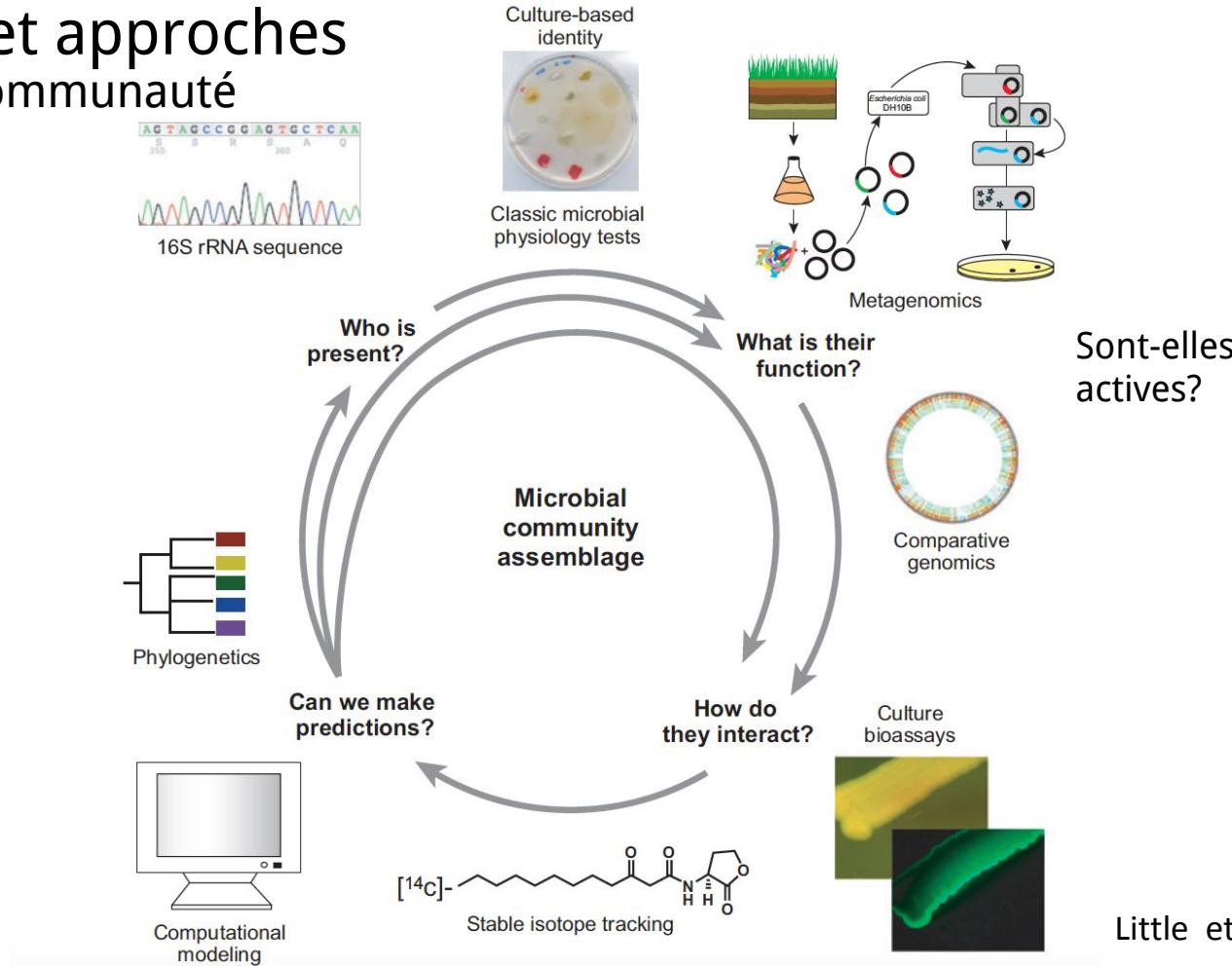
Écosystème



Paysage

Questions et approches

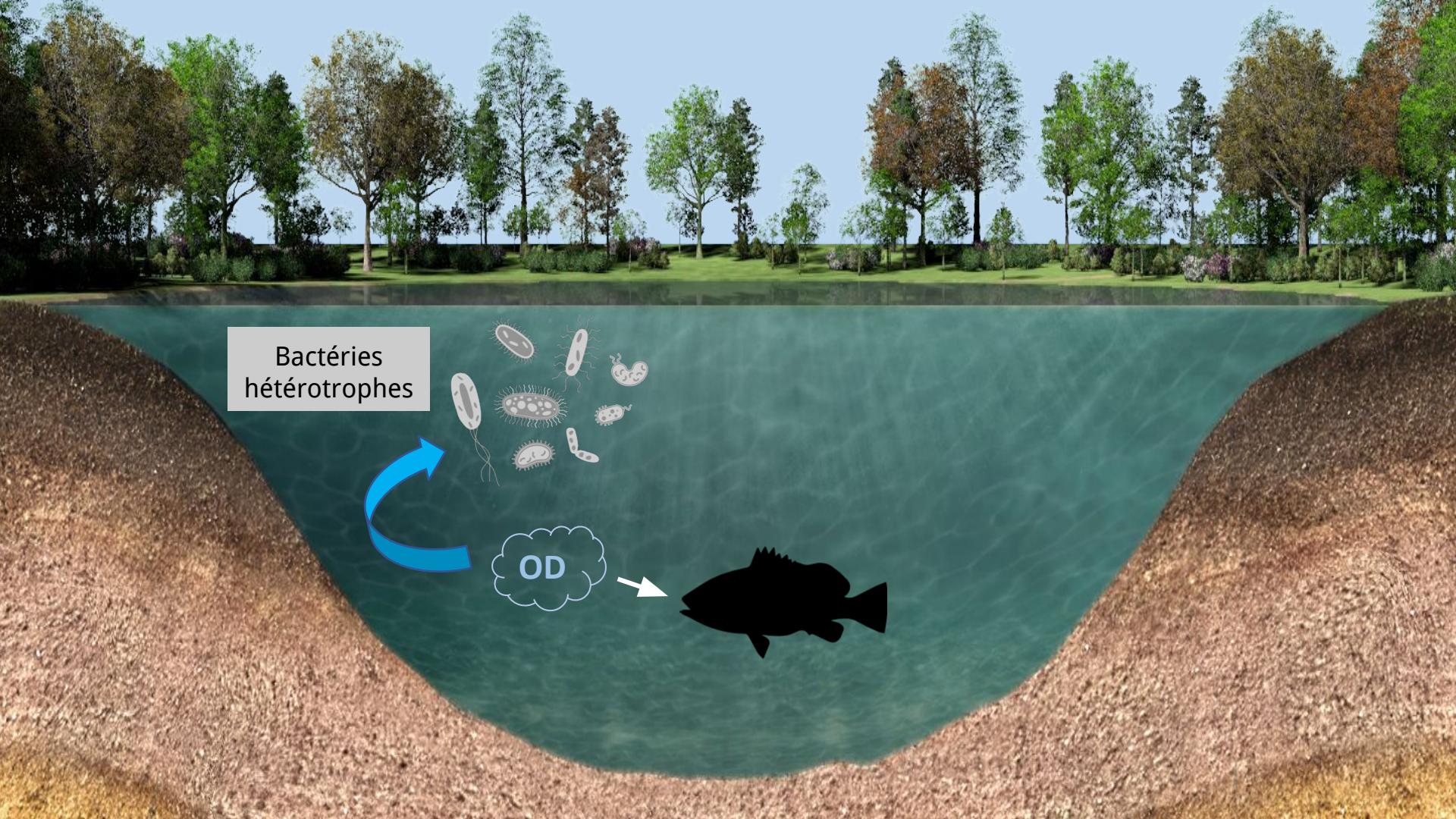
Niveau de la communauté



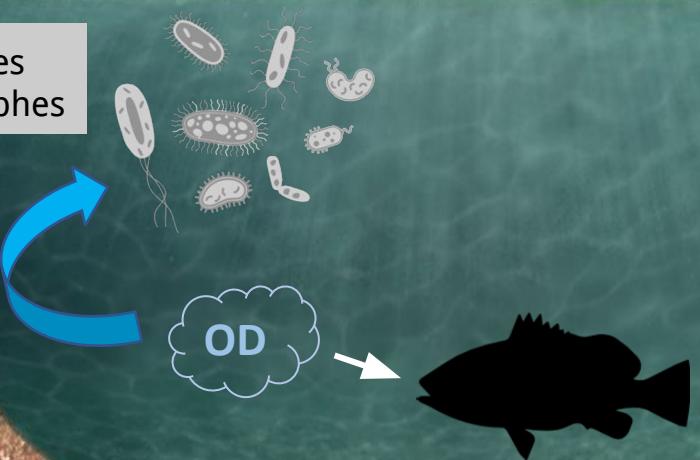
Little et al. 2008

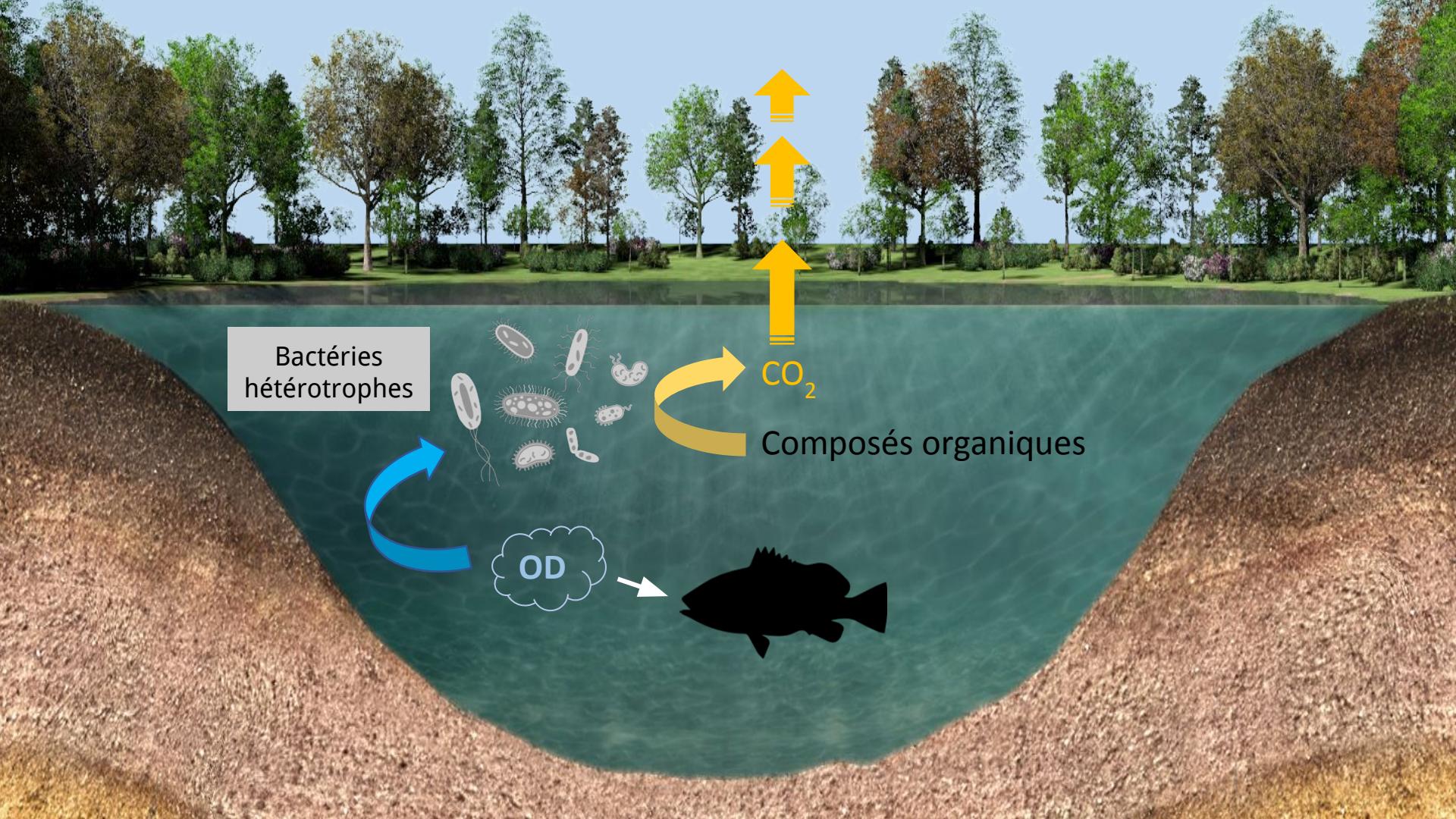


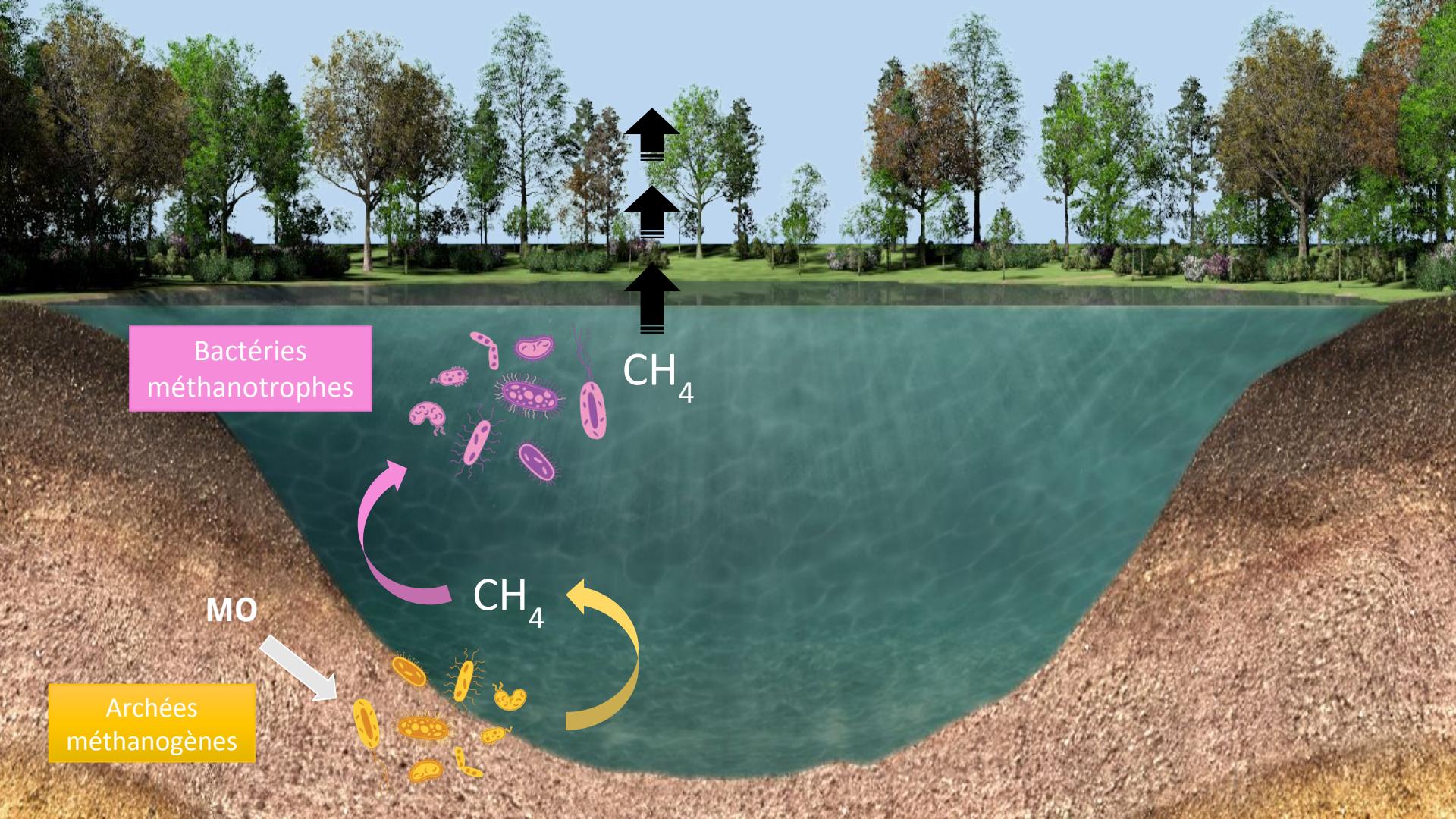
Pourquoi sont-elles importantes ?



Bactéries
hétérotrophes







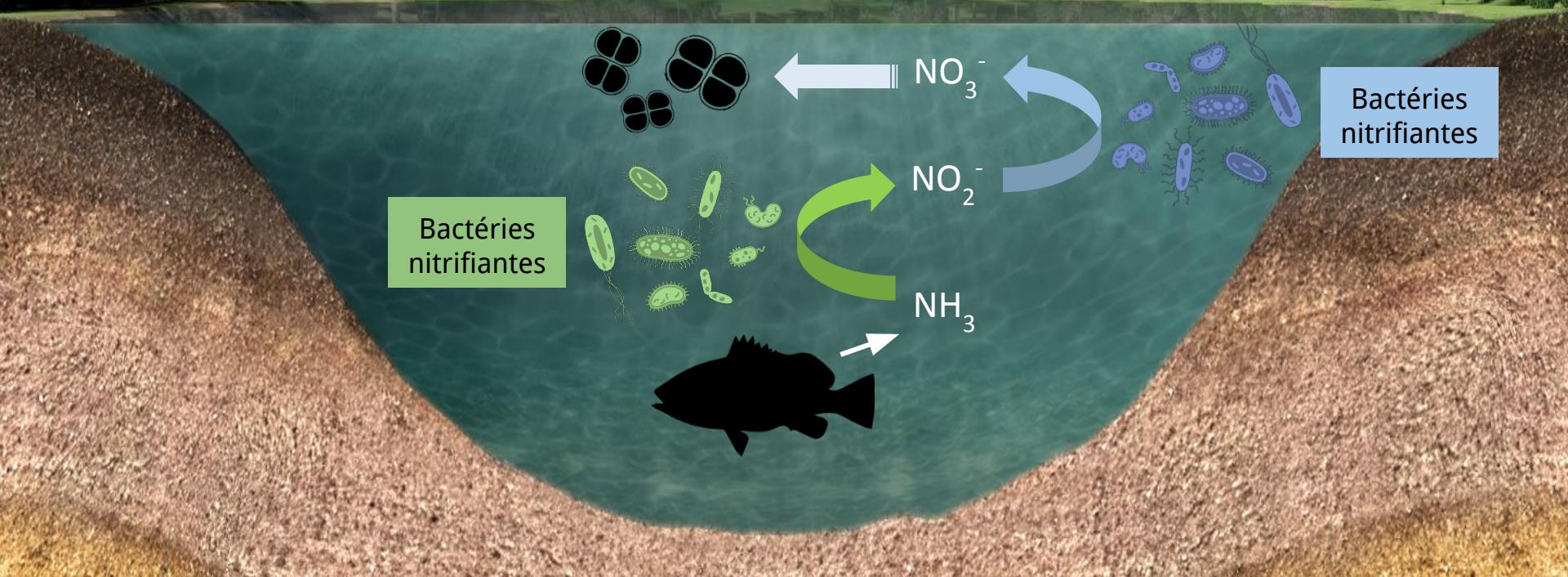
Bactéries
méthanotrophes



MO

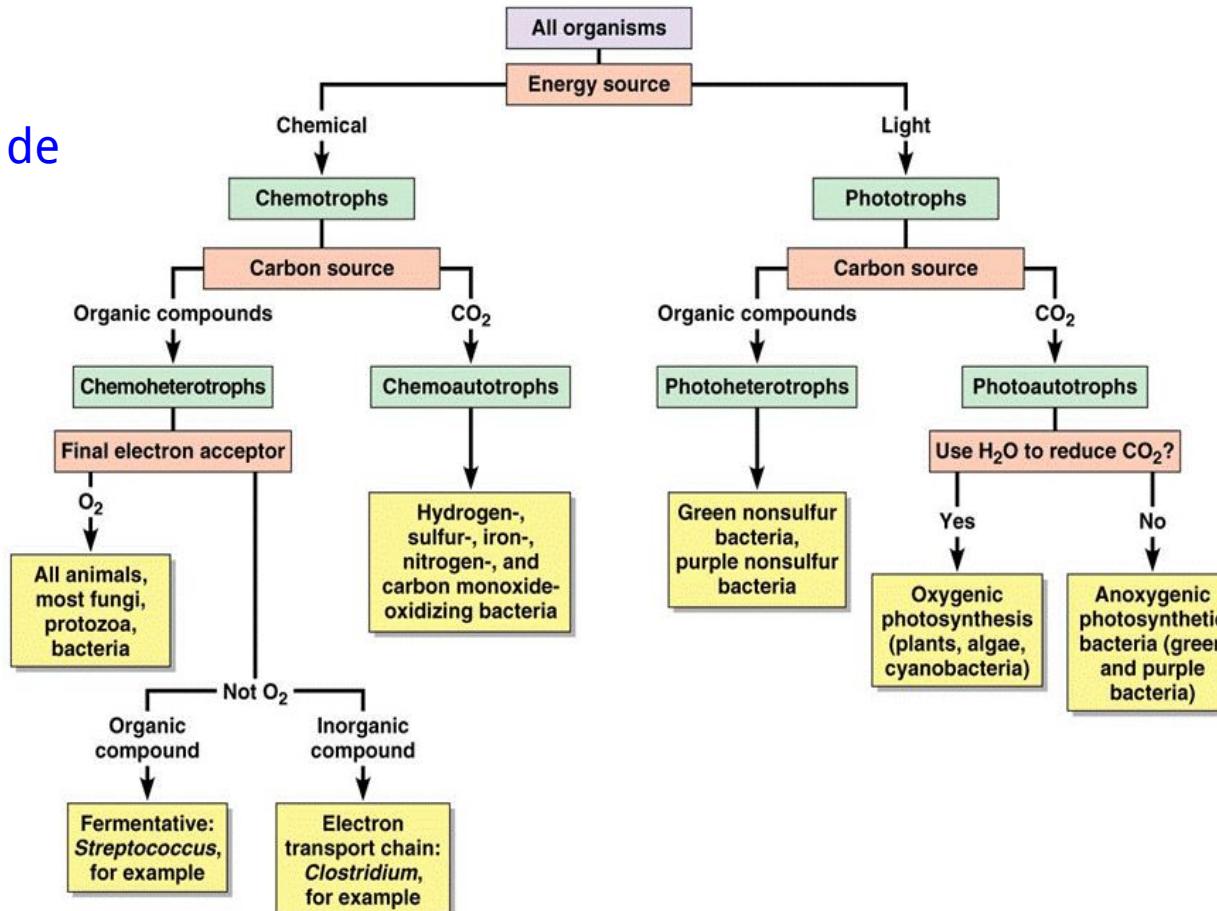
Archées
méthanogènes





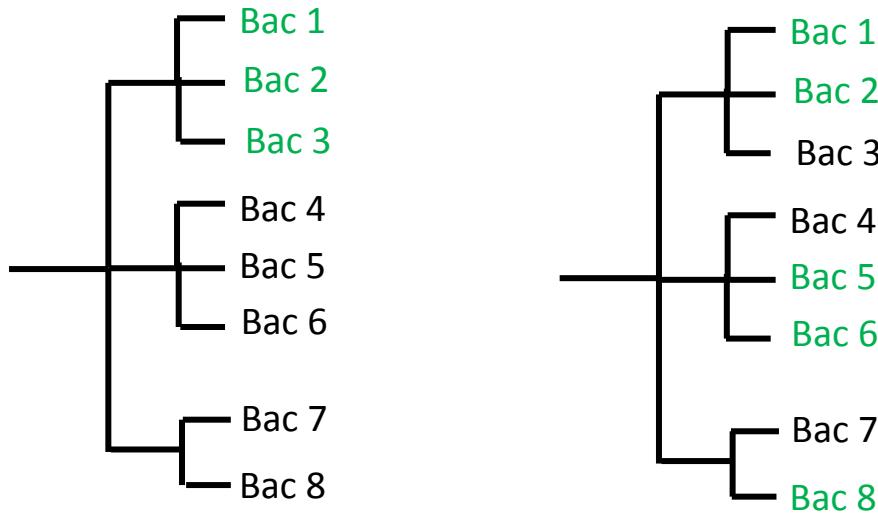
Chez les bactéries, le métabolisme est très varié!

Sources d'énergie et de carbone



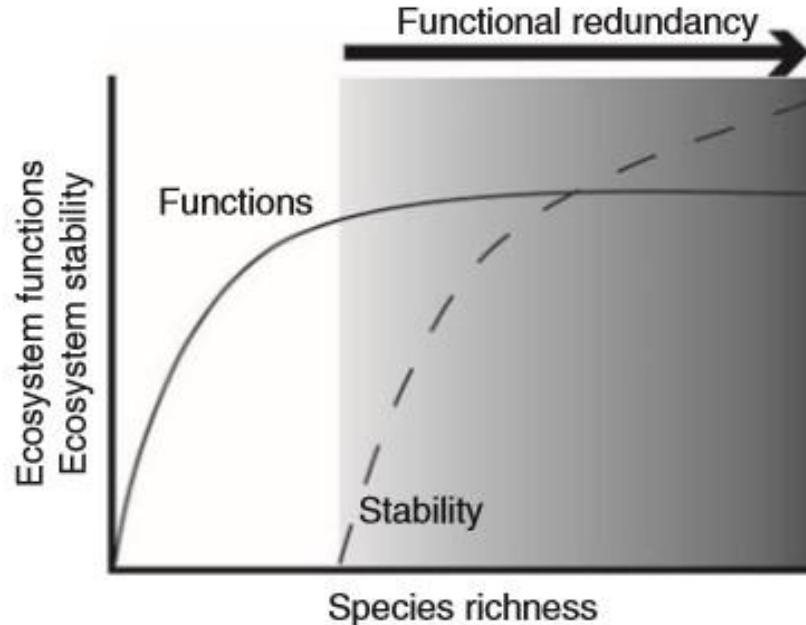
Chez les bactéries, le métabolisme est très varié!

Le métabolisme peut être associé ou non avec l'affiliation phylogénétique.



Redondance fonctionnelle et stabilité de l'écosystème

- **Fonction:**
la capacité à effectuer
une fonction
écologique/ processus
biogéochimique.
Ex. réduction de sulfate
- **Gènes fonctionnels**



L'activité microbienne au centre des processus de l'écosystème

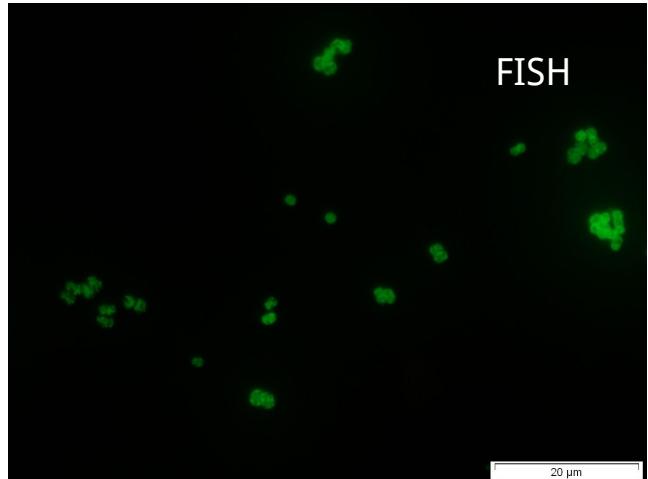
- Qu'est ce qui régule leur présence, abondance, et activité ?
- Comment est-ce que l'affiliation taxonomique est reliée à les processus/fonctions ?

Comprendre ces mécanismes est important pour prédire les changements dans l'écosystème dû à plusieurs facteurs d'impacts : l'eutrophisation, le réchauffement climatique, la construction de barrages, l'invasion d'espèces exotiques, etc...

Mesurer le microbiome

Quantifier les bactéries:

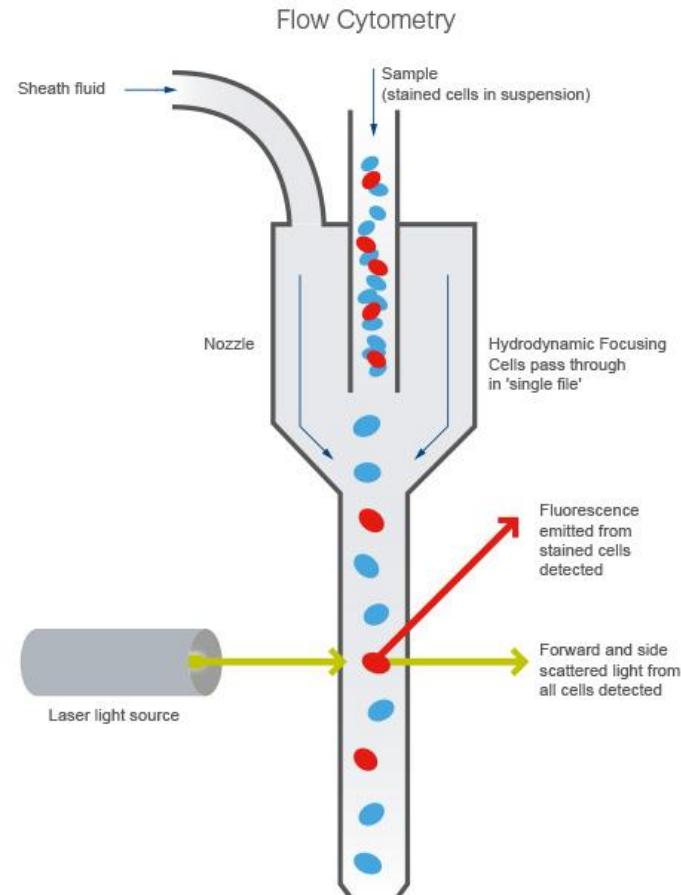
- Microscopie
 - DAPI
 - FISH – groupes spécifiques



Mesurer le microbiome

Quantifier les bactéries:

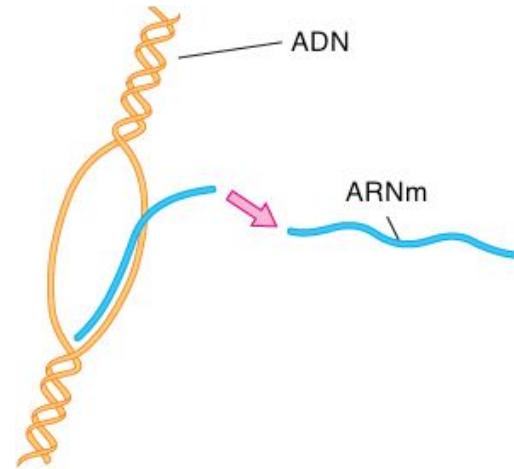
- Microscopie
 - DAPI
 - FISH - groupes spécifiques
- Cytomètre de flux



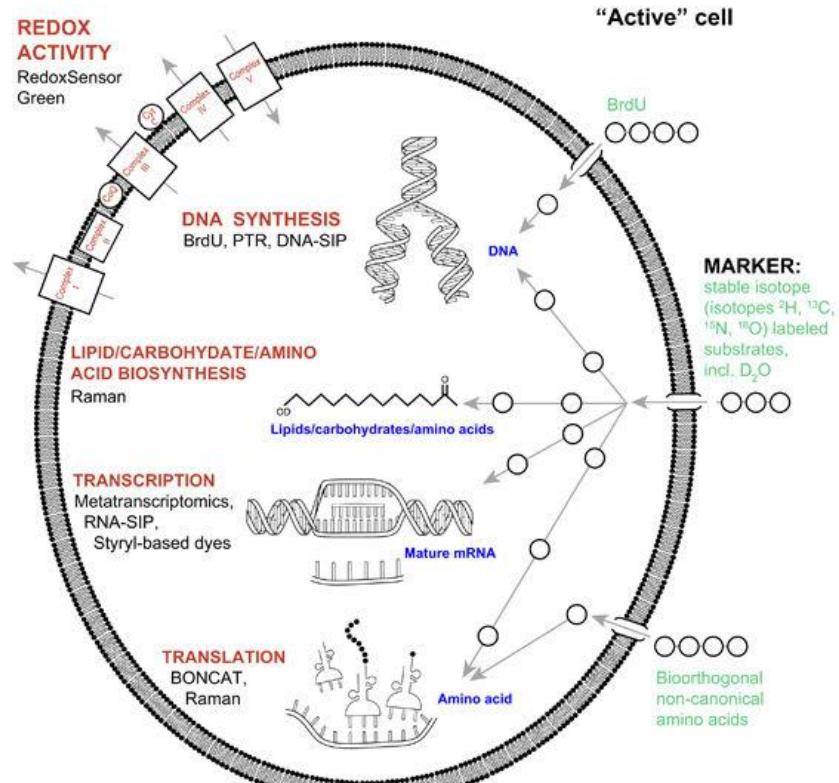
Mesurer le microbiome

Mesurer l'**activité** microbienne:

- Transcription des gènes fonctionnels
- qPCR – quantifier la transcription des gènes
- Techniques de marquage



Les techniques de marquage peuvent cibler différents processus cellulaires

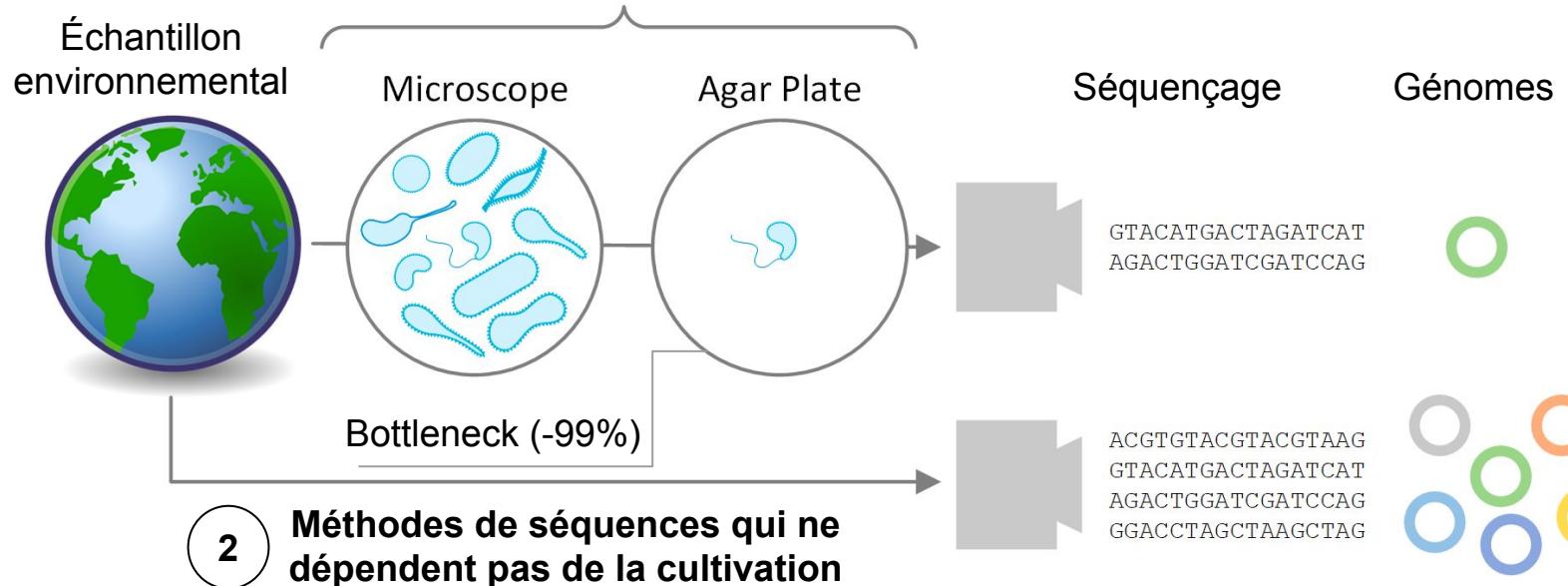


- Synthèse d'ADN
- Biosynthèse de lipide/ carbohydrate/ acides aminés
- Synthèse d'ARNm (transcription)
- Synthèse de protéines (traduction)

“The Great Plate Count Anomaly”

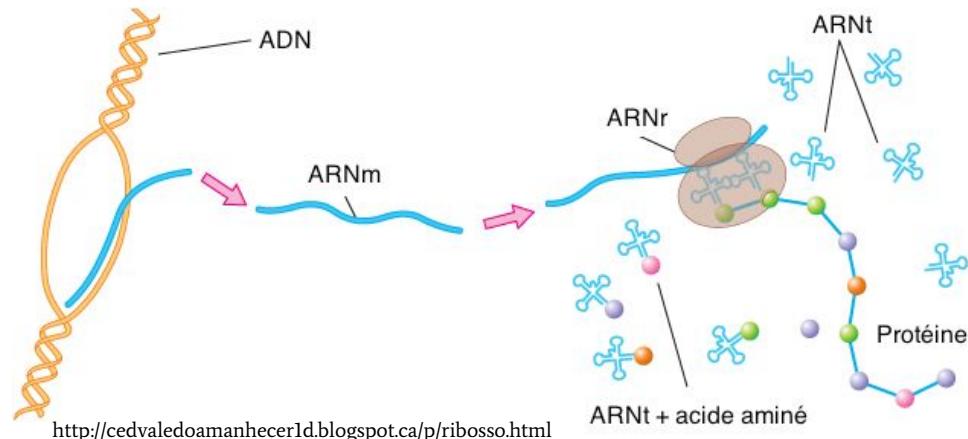
1 Méthodes qui dépendent de la culture

Seulement une fraction des bactéries sont cultivables



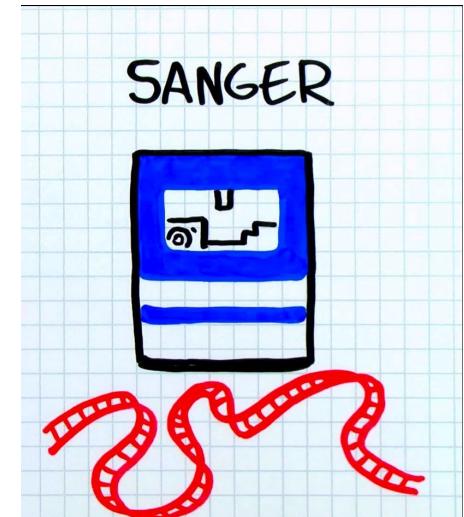
Méthodes indépendantes de la culture

- Basés sur la séquençage d'ADN
 - Dépendre d'extraction d'ADN ou ARN
 - ADN: composition de la communauté biologiques, relations évolutives et phylogénétiques
 - ARN: expression génétique



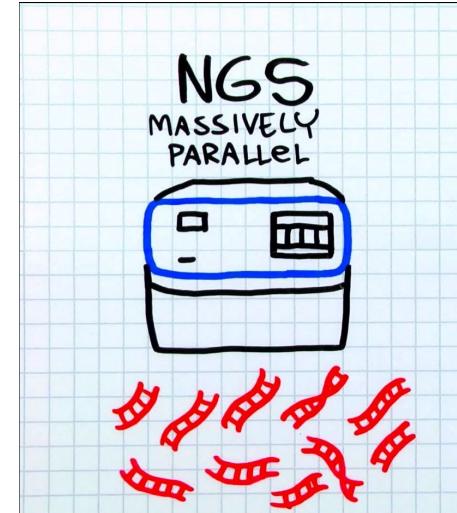
Méthodes basées sur le séquençage d'ADN

- Séquençage traditionnel (Sanger)
 - Une séquence à la fois
 - Isolation des séquences différentes avant le séquençage



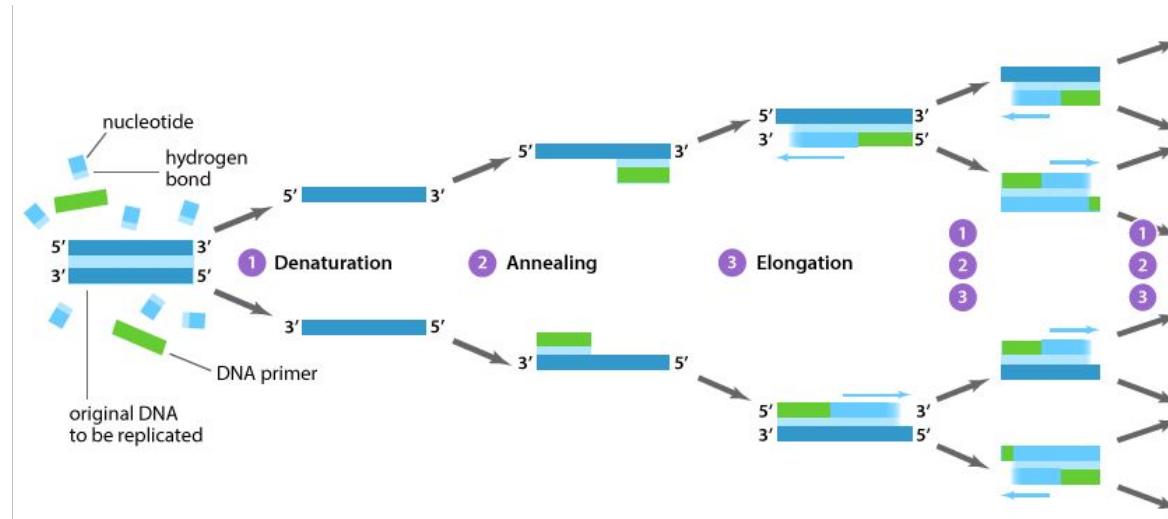
Méthodes basées sur le séquençage d'ADN

- Next Generation Sequencing (NGS)
 - Toutes les séquences en même temps (sequencing-by-synthesis)
 - L'isolation des séquences est faite après le séquençage (bioinformatique)



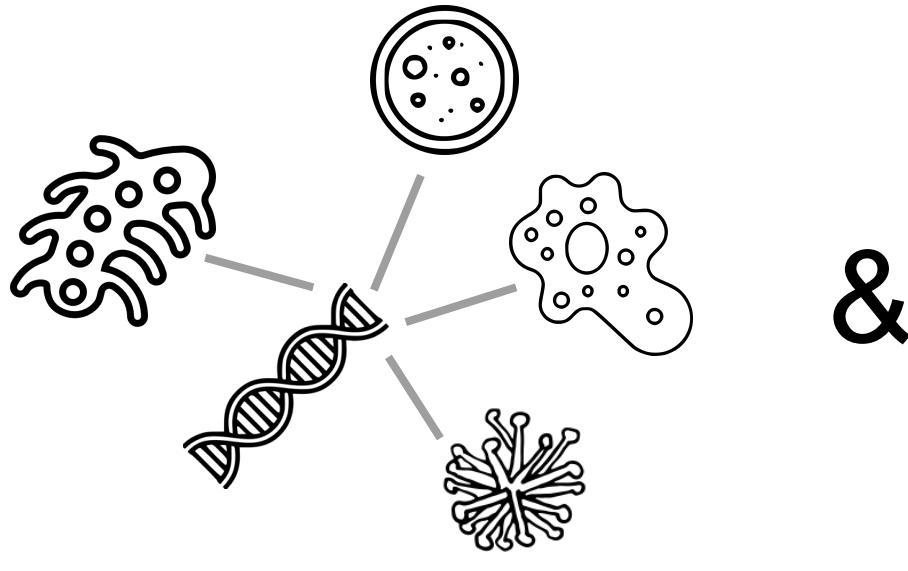
Méthodes basées sur le séquençage d'ADN

- Basés sur l'amplification par PCR en général
- PCR ⇒ de l'anglais “Polymerase Chain Reaction”
 - Amplification des séquences cibles d'ADN
- Amplification préférentielle des + abondantes ⇒ semi-quantitative

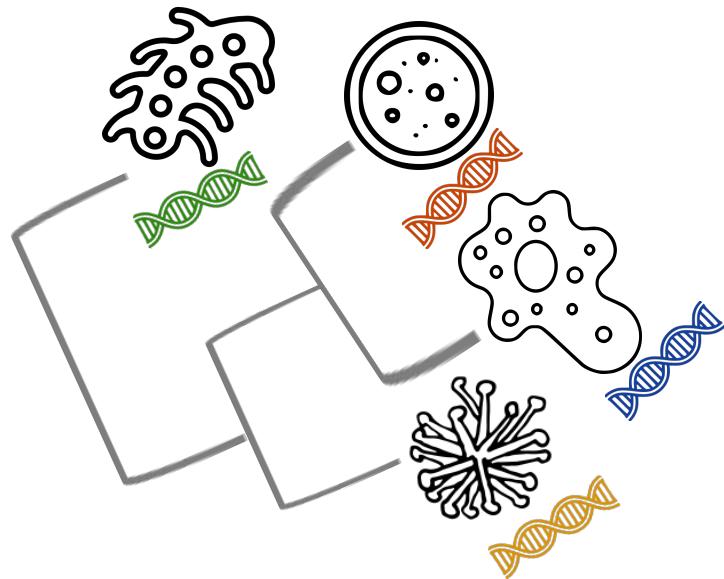


Quelle région amplifier?

- Il faut choisir un gène:
 - Présent dans tous les organismes
 - Conservé dans l'espèce, mais avec des régions variables à travers les espèces



&

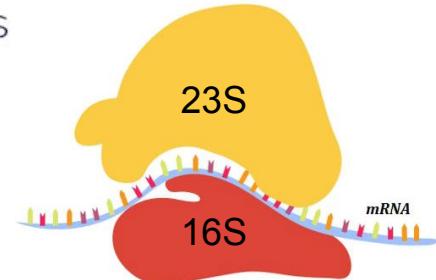


Exemple de régions cibles pour les études de diversité



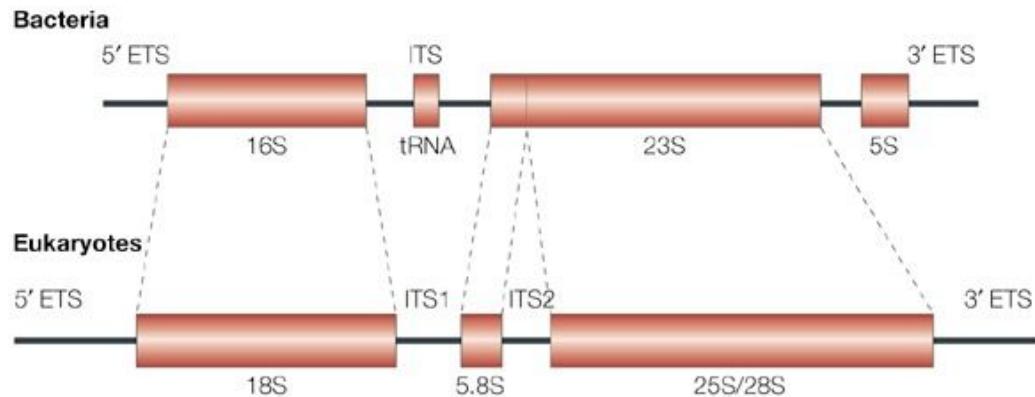
16S rRNA Gene

Variable Regions

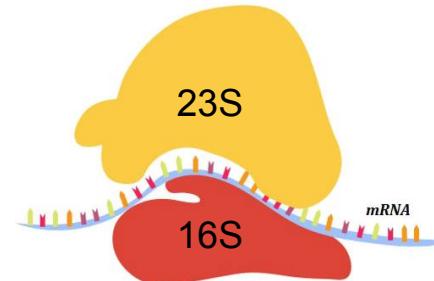
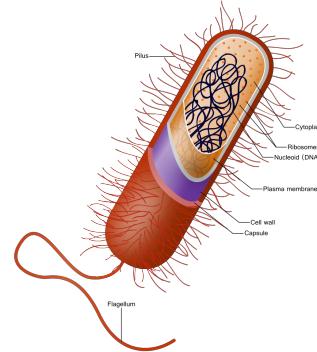


Séquences les plus utilisées

- Pour les organismes prokaryotes
 - Le gène de la sous-unité 16S d'ARNr
 - Le 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer)



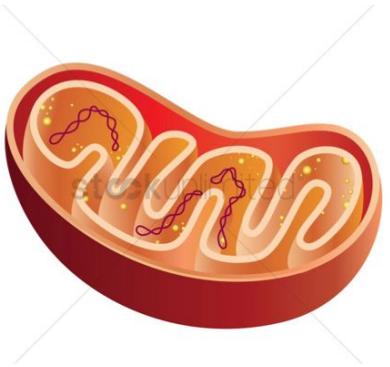
Nature Reviews | Molecular Cell Biology



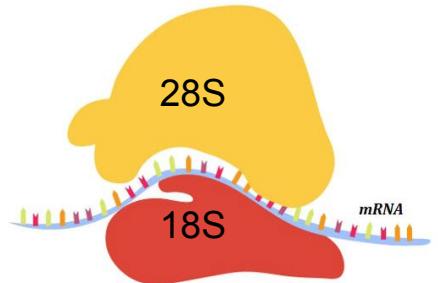
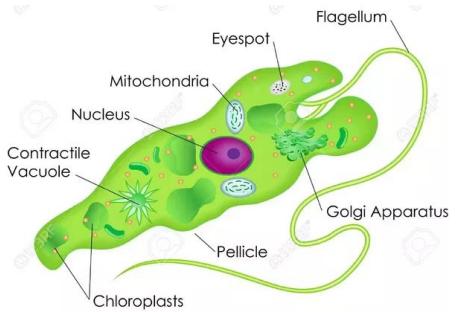
<http://biologianet.uol.com.br/biologia-cellular/ribosomos.htm>

Séquences les plus utilisées

- Pour les microorganismes eukaryotes
 - Le gène de la sous-unité 18S d'ARNr
 - Le ITS (Internal Transcribed Spacer)
 - Le COI (cytochrome c oxidase I) de l'ADN mitochondrial



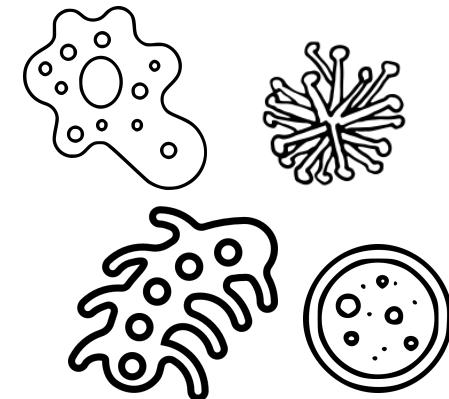
https://www.stockunlimited.com/vector-illustration/mitochondria_1815143.html



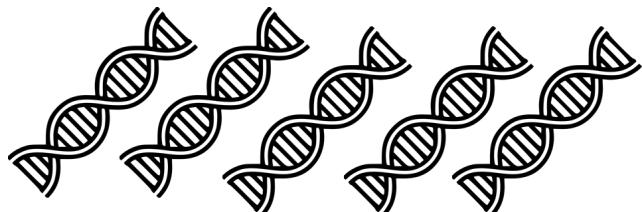
<http://biologianet.uol.com.br/biologia-celular/ribosomos.htm>



Méthodes d'isolation des séquences d'ADN

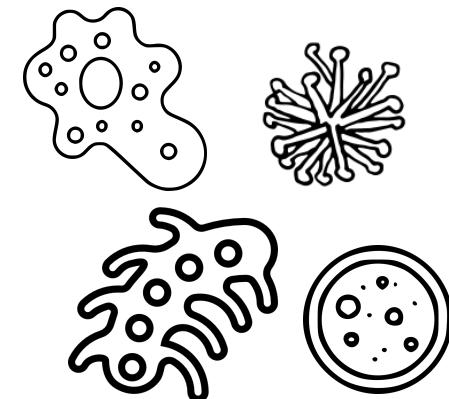


- Après l'amplification d'une région spécifique du génome trouvé dans tous les individus dans la communauté...

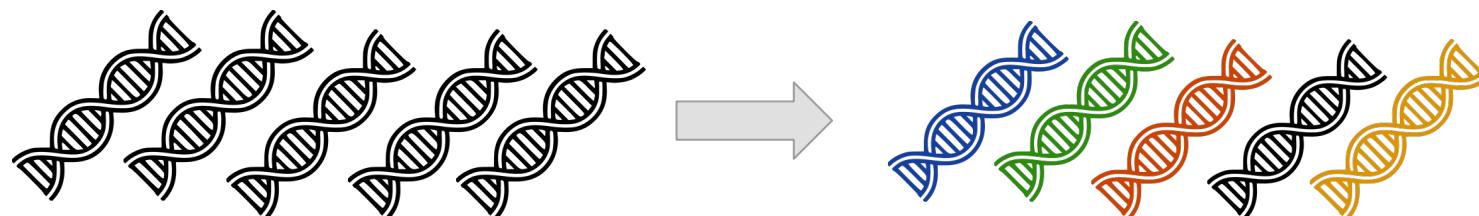




Méthodes d'isolation des séquences d'ADN



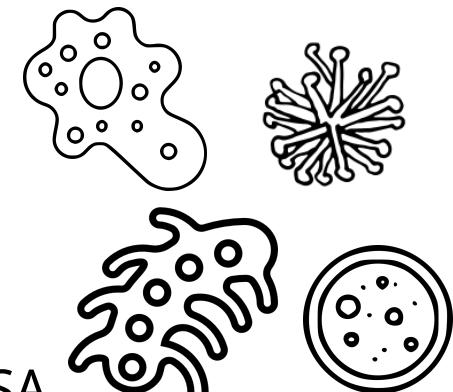
- Après l'amplification d'une région spécifique du génome trouvé dans tous les individus dans la communauté...
- Il faut séparer les espèces différentes



Community fingerprinting



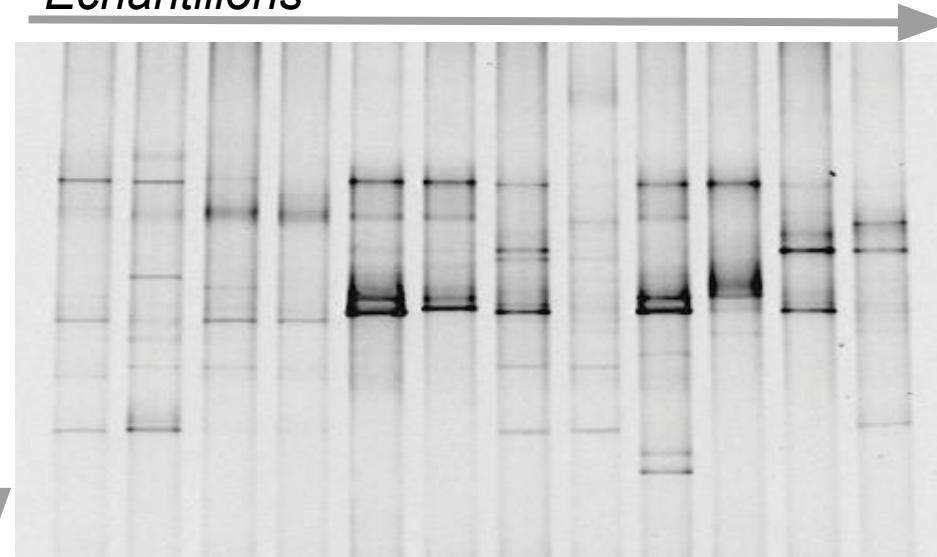
Community fingerprinting



- Examples: DGGE/TGGE, ARDRA, RFLP, T-RFLP, ARISA...

Échantillons

Espèces



Séquençage de l'ADN à haut débit (HTS: High-throughput sequencing)

Aussi appelé “NGS” pour “Next Generation Sequencing”

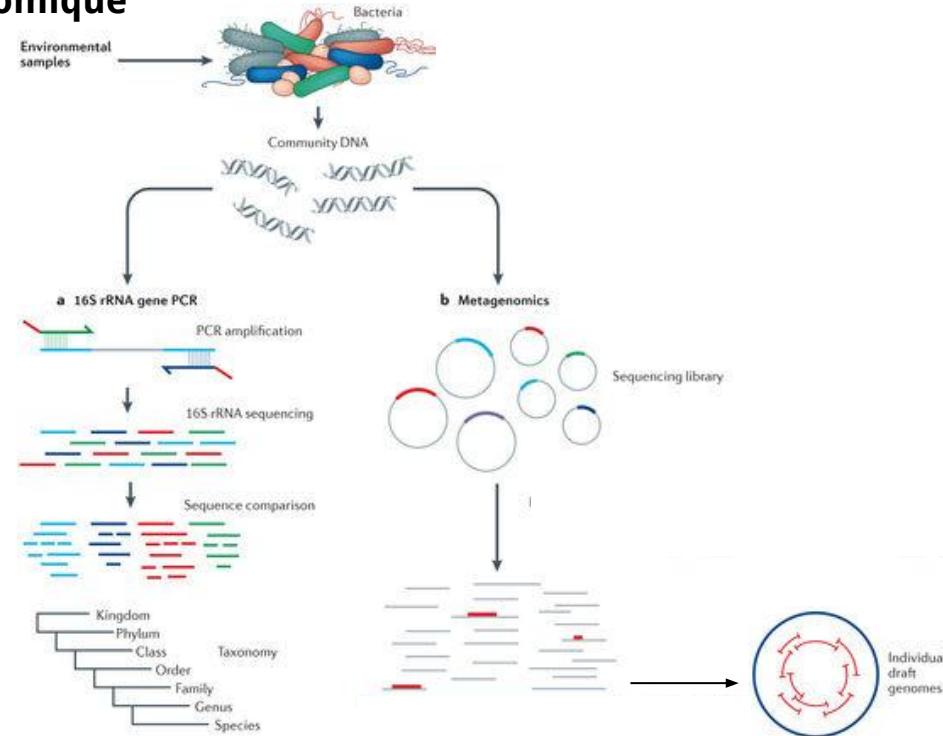
Les différentes méthodes varient par leur:

- Longueur de lecture (longueur de la séquence)
- Précision (base)
- Lecture par expérience (combien de séquences)
- Temps de lecture (la durée)
- Coût (\$\$!)

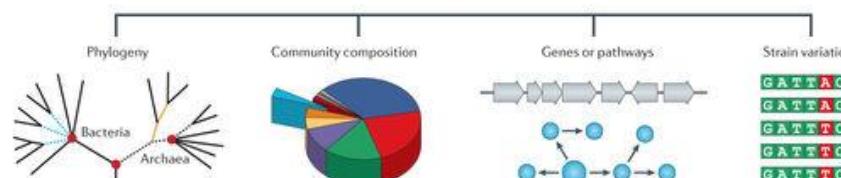
Chaque méthode a des avantages et inconvénients.

Deux méthodes populaires: 16S et la métagénomique

- 1) Échantillonnage:
environnement de votre choix
- 2) Séquençage NGS (high-throughput)
- 3) Amplification des séquences à l'aide
du PCR



- 4) Analyses



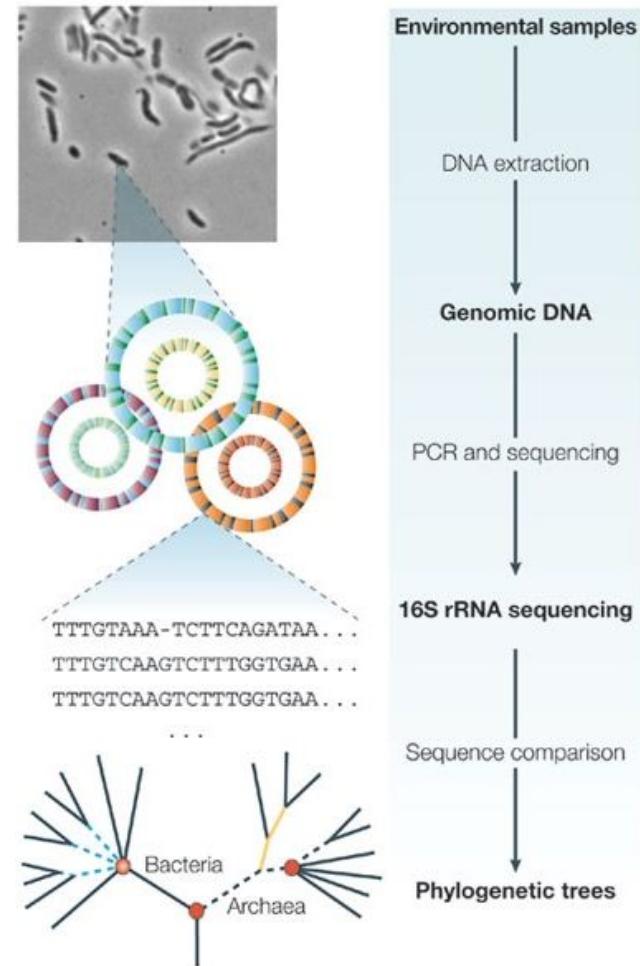
Séquençage de l'ARNr 16S (16S rRNA)

Qu'est-ce que c'est?

l'ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes. Les eukaryotes ont le 18S.

Pourquoi?

Un gène marqueur phylogénétique à cause de sa conservation à travers les domaines de la vie, mais juste assez variable entre les espèces

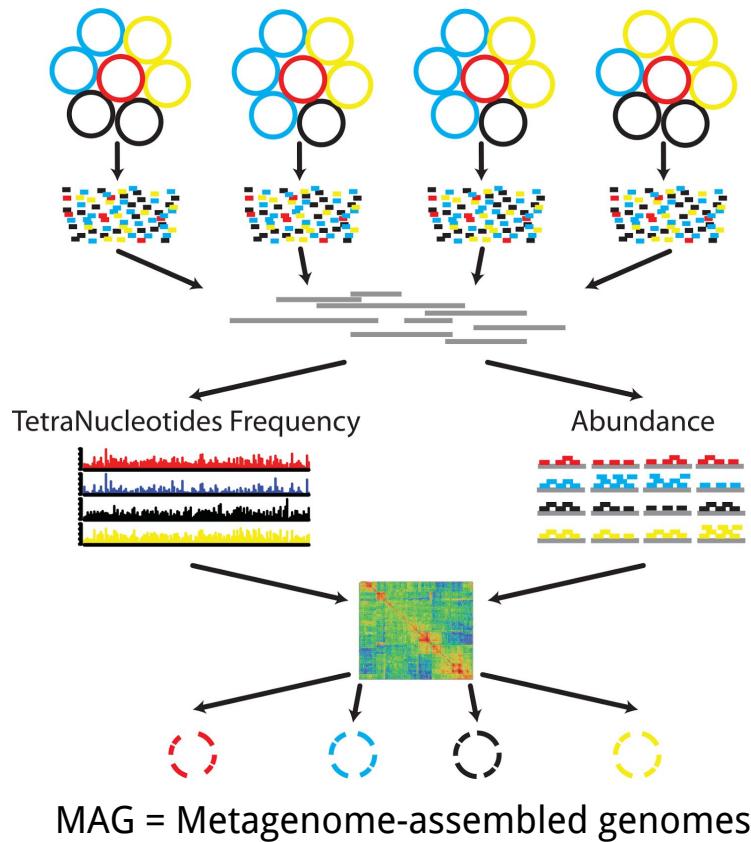


Metagénomique

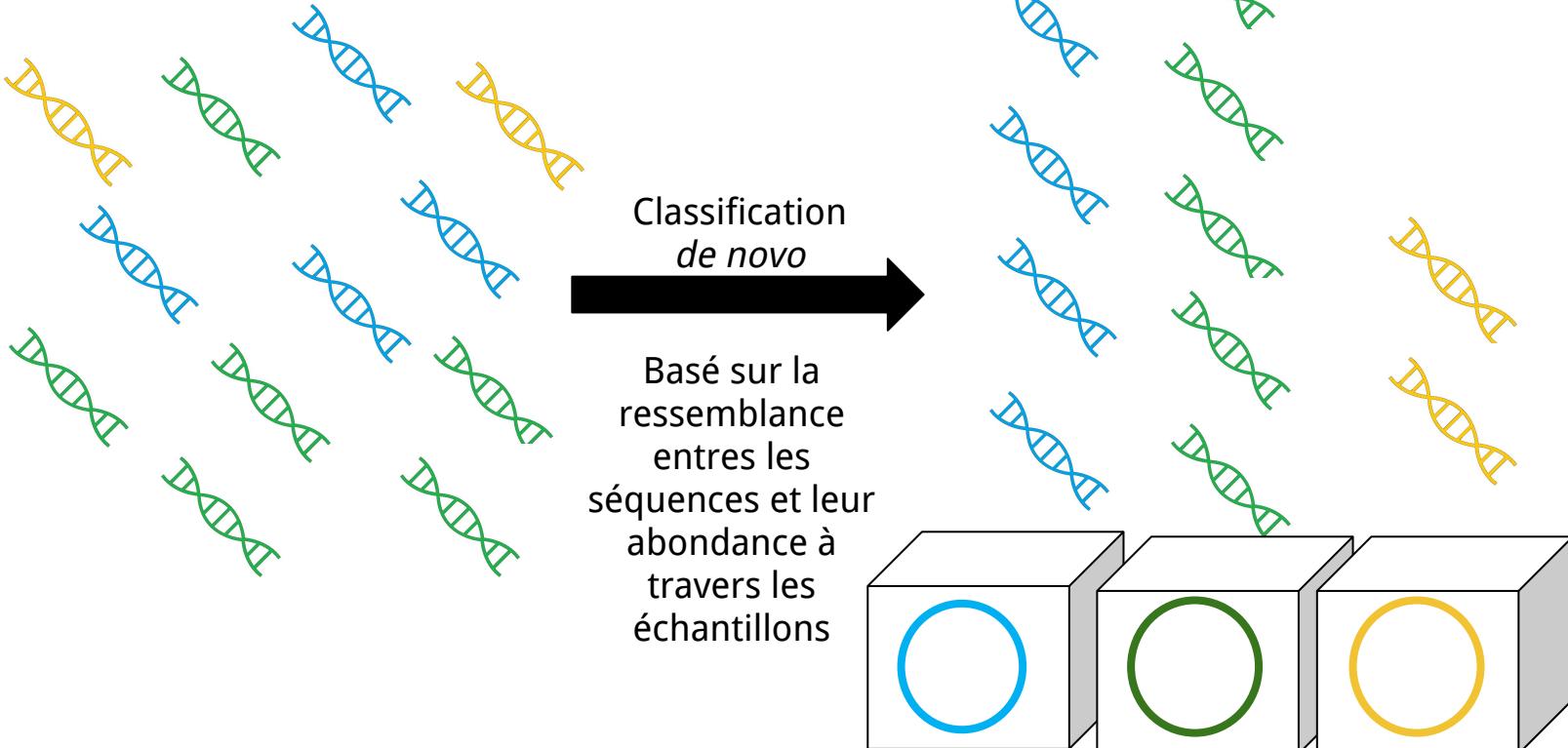
Définition: l'étude du contenu génétique d'échantillons issus d'environnement complexes.

Contrairement à la méthode du aRNA 16S, cette méthode ne cible pas seulement un gène, mais tout l'ADN contenu. Cette méthode permet d'étudier **tout le potentiel génomique et métabolique** d'un échantillon environnemental.

Identification → Fonction



Metagenomic binning: la classification des séquences dans des paniers afin de reconstituer des génomes.



Metagenome-Assembled-Genomes (MAG) aussi appelé "bin"
(comme un panier)

Atelier pratique

Choisissez votre propre aventure!

3 scénarios, des vraies données 16S rRNA provenant de:

- 1) Lac tempéré et lac tropical
- 2) Photosynthèse oxygénique et anoxigénique
- 3) Lac des statut trophique différent (eutrophique et oligotrophique)

Ce que vous allez faire:

Aligner des séquences 16S rRNA, créer un arbre phylogénétique, visualizer et "désigner" l'apparence de votre image

Délivrables:

- Créer un arbre phylogénétique de format publication.

Mise au point:

- Mini discussion sur vos résultats

Des questions à répondre:

- Comment déduire sur l'écologie microbienne (diversité, structure, métabolisme) à partir de phylogénie
- La diversité des procédés métabolique dans les lacs
- La diversité des microbes

Des concepts qui vous seront utile:

- Comment chercher des données dans les bases de données, les formats d'exportation, avoir un esprit critique sur les données non-vérifiées ("self-published" ou "uncurated data")
- Théorie en phylogénomique
- Workflow pour créer un arbre phylo (peut être utilisé pour d'autre organismes aussi par ex. Diatomées, animaux, etc.)

Atelier pratique

Choisi

3 scénarios

- 1) Lac tropical
- 2) Lac eutrophique et anoxigénique

statut trophique différent (eutrophique et
hypotrophique)

Ce que vous allez faire:

Aligner des séquences 16S rRNA, créer un arbre phylogénétique, visualizer et "désigner" l'apparence de votre image

Délivrables:

- Créer un arbre phylogénétique de format publication.

Mise au point:

- Mini discussion sur vos résultats

N'oubliez pas d'apporter votre ordinateur!

propre aventure!

données 16S rRNA provenant de:

Des questions à répondre:

- Comment déduire sur l'écologie microbienne (diversité, structure, métabolisme) à partir de phylogénie
- La diversité des procédés métabolique dans les lacs
- La diversité des microbes

Des concepts qui vous seront utile:

- Comment chercher des données dans les bases de données, les formats d'exportation, avoir un esprit critique sur les données non-vérifiées ("self-published" ou "uncurated data")
- Théorie en phylogénomique
- Workflow pour créer un arbre phylo (peut être utilisé pour d'autre organismes aussi par ex. Diatomées, animaux, etc.)

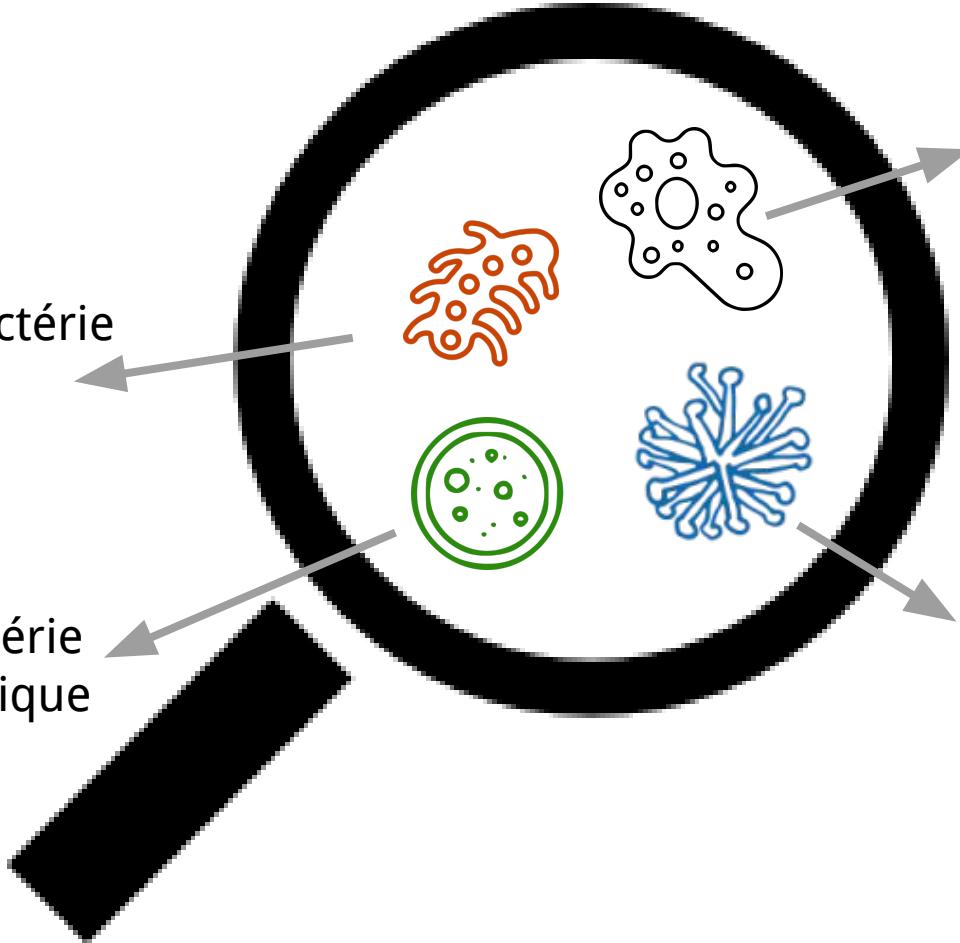
Merci!

Julie, la bactérie sulfureuse

Marie, la bactérie photosynthétique

Antoine, la bactérie méthanotrophique

Fred, la bactérie fixeuse d'azote



Introduction to the scenario (Workshop Session)

Scenario 1: Temperate versus tropical lakes

Quels sont les facteurs qui pourraient influencer la distribution des bactéries dans ces 2 écosystèmes?

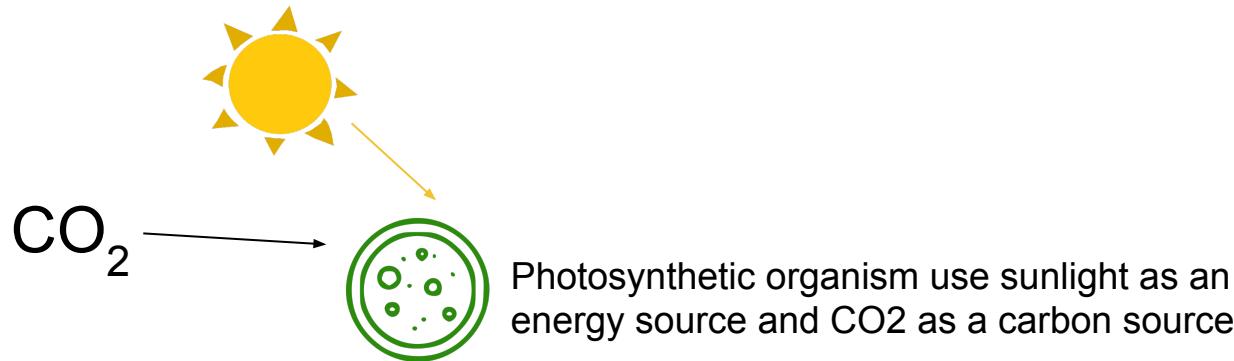
- Saisonnalité
- Température
- Quantité de nutriments (phosphore, azote) (oligotrophique, mesotrophique, eutrophique)

Scenario 1: Temperate versus tropical lakes

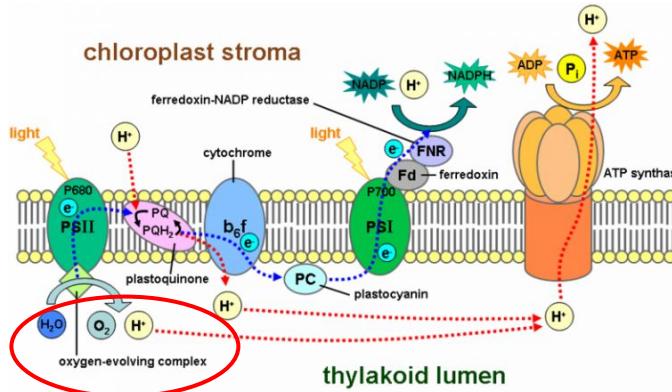
Lac Croche est un lac tempéré, avec une forte stratification durant l'été, et un hypolimnion anoxique à la fin de l'été. Ce lac est dimictique, une fois au printemps après la fonte des glaces et une fois en automne.

Lac X est un

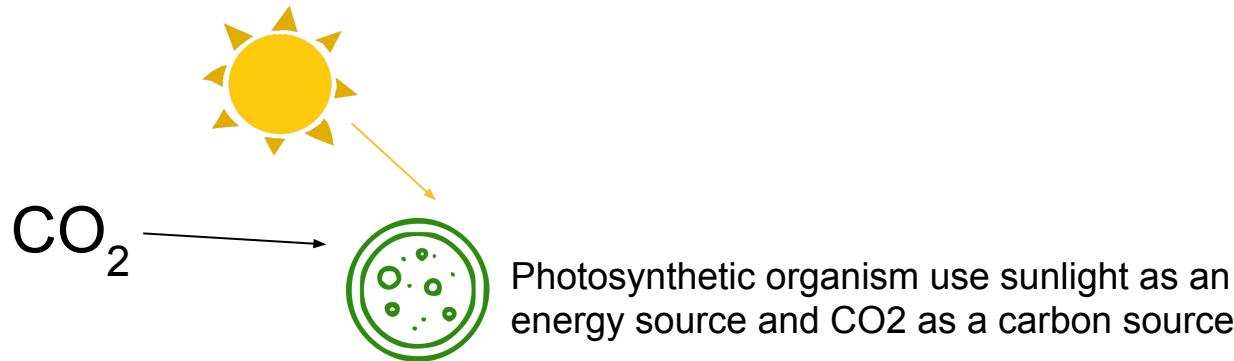
Scenario 2: Exploring anoxygenic and oxygenic photosynthesis



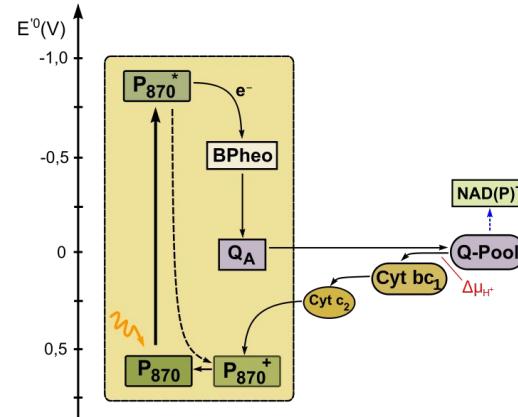
In oxygenic photosynthesis, water is hydrolysed, oxygen is released as a by product



Scenario 2: Exploring anoxygenic and oxygenic photosynthesis



But in anoxygenic photosynthesis, it is a cyclic process. Oxygen is not released, water is not used as an electron donor among other differences.



Scenario 2: Exploring anoxygenic and oxygenic photosynthesis

Oxygenic vs Anoxygenic Photosynthesis	
Oxygenic photosynthesis is the process which converts light energy to chemical energy by certain photoautotrophs by generating molecular oxygen.	Anoxygenic photosynthesis is the process which converts light energy to chemical energy by certain bacteria without generating molecular oxygen.
Generation of Oxygen	
Oxygen is released as a by-product.	Oxygen is not released or generated.
Organisms	
Oxygenic photosynthesis is shown by cyanobacteria, algae, and green plants.	Anoxygenic photosynthesis is mainly shown by purple bacteria, green sulfur and nonsulfur bacteria, heliobacteria, and acidobacteria.
Electron Transport Chain	
Electrons travel via several electron carriers.	It occurs via cyclic photosynthetic electron chain.
Water as an Electron Donor	
Water is used as the initial electron donor.	Water is not used as an electron donor.
Photosystem	
Photosystem I and II are involved in oxygenic photosynthesis	Photosystem II is not present in anoxygenic photosynthesis
Generation of NADPH (reducing power)	
NADPH is generated during the oxygenic photosynthesis.	NADPH is not generated because electrons cycle back to the system. Hence reducing power is obtained from other reactions.

Only 1 bacterial group: it should cluster in the tree

A lot more diversity

Scenario 2: Exploring anoxygenic and oxygenic photosynthesis

Purple sulfur bacteria: Chromatiales (Order)

Purple non sulfur bacteria: Rhodospirillaceae (Family)

Green sulfur bacteria: Chlorobi (family)

Green non sulfur bacteria: Chloroflexi (Class)

Heliobacteria: Heliobacteriaceae (Family)

Acidobacteria: Acidobacteria (Phylum)

Scenario 3: Healthy versus unhealthy lakes

Figure 1.1. Conceptual diagram comparing a healthy system with no or low eutrophic condition to an unhealthy system exhibiting eutrophic symptoms.

