

1. LABORATOIRE

Nom ou sigle : Carrtel

Statut : Unité Mixte de Recherche (UMR) n°A42

Laboratoire partenaire ou collaborations éventuels :

AutreUMR Ecologie Microbienne, Lyon

2. DIRECTION DE THÈSE

Directeur de thèse (HDR) : Isabelle DOMAIZON- isabelle.domaizon@thonon.inrae.fr

Codirecteur éventuel : David ETIENNE (david.etienne@univ-smb.fr) & Emilie LYAUTEY (emilie.lyautey@univ-smb.fr)

Domaine de compétences de l'ED SISEO : Environnement

3. SUJET DE THÈSE

Titre : Comment mieux intégrer la diversité microbienne pour caractériser l'évolution des pressions locales sur les écosystèmes lacustres

4. RESUME

Les sédiments lacustres sont des archives précieuses car ils enregistrent les conditions environnementales locales et globales et permettent de reconstituer leurs évolutions respectives au cours des derniers millénaires. Ainsi cette archive représente une opportunité majeure pour comprendre, sur des échelles de temps longs, l'évolution des conditions environnementales et leur impact sur les communautés passées pour prédire comment les futurs changements environnementaux affecteront les propriétés des écosystèmes et leur diversité biologique. Dans les écosystèmes lacustres, comprendre l'impact de ces changements globaux sur les communautés microbiennes est un enjeu majeur des recherches scientifiques, actuelles et à venir, puisque des modifications de la diversité et donc des fonctions associées supportées par ces microorganismes affecteront, théoriquement, la résilience des écosystèmes et de l'ensemble des organismes qu'ils abritent, ainsi que de la capacité de ces milieux à résister aux changements globaux actuels et futurs. L'analyse de l'ADN subfossile préservé dans les sédiments lacustres représente depuis quelques années l'un des développements les plus prometteurs en paléoécologie, élargissant la palette des données biologiques extraites lors de l'étude de ces archives continentales. Toutefois, ces approches n'ont que trop rarement été déployées afin d'intégrer les microorganismes (micro-eucaryotes, bactéries et archées), qui pourraient constituer de précieux indicateurs des changements globaux et locaux affectant les systèmes lacustres. La reconstruction de la diversité passée de ces communautés microbiennes et de son évolution temporelle reste un défi. Ce sujet de thèse vise donc à développer une approche intégrative et holistique afin d'appréhender la complexité in natura des communautés microbiennes des trois domaines de la vie au sein des écosystèmes lacustres. Dans ce sujet, la stratégie d'étude simultanée des archées, bactéries et eucaryotes, considérant à la fois les fractions microbiennes présentes et actives, permettra d'étudier les microbiomes et leurs dynamiques sur une large échelle temporelle et d'espace en intégrant des questions clefs d'écologie microbienne et de paléo-génomique centrées sur les communautés aquatiques et terrestres archivées dans le compartiment sédimentaire.

Long-term understanding of past environmental conditions and past biological communities is a key challenge to predict how future environmental changes will affect ecosystem properties and biological diversity. Lake sediments are particularly relevant archives because of their ability to record both local and global environmental conditions, and to reconstruct temporal evolutions over the last millennia. In lake ecosystems, understanding the impact of anthropogenic stresses on microbial communities is a major challenge for current and future scientific research. Changes in microorganism diversity are likely to affect associated functions and will theoretically impact the resilience of these environments. As a consequence, lake ecosystems might be affected and less prone to resist to current and future environmental changes. Although multiple paleo-limnological studies have already been developed on several lake ecosystems around the world, the analysis of subfossil DNA preserved in lake sediments is currently identified as one of the most promising developments in paleoecology, expanding the range of biological data that can be extracted from lacustrine sediments studies. While the use of genomic approaches has been successfully developed and applied for reconstructing long-term dynamics of microbial eukaryotes, few similar application has yet been applied on microorganisms (micro-eukaryotes, bacteria and archaea), although they may represent valuable indicators of global and local environmental changes affecting the lake ecosystem. This thesis aims to develop an integrative and holistic approach to understand the in natura complexity of microbial communities in the three domains of life within lake ecosystems. In this project, the strategy is to simultaneous study archaea, bacteria and micro-eukaryotes, considering both the present and active microbial fractions, to understand microbiomes and their dynamics on large time and space scales. This will integrate questions relevant of microbial ecology and paleogenomic centered both on the aquatic and terrestrial communities archived in the sedimentary compartment.

5. PROJET DE RECHERCHE DETAILLE

Contexte Les changements globaux actuels, provoqués par les activités humaines, entraînent de nombreux effets sur les conditions climatiques et les habitats induisant une extinction majeure des espèces animales et végétales, et une perte de biodiversité perturbant le fonctionnement des écosystèmes et les services associés. Tandis que les pertes en espèces, communautés et habitats pour les organismes supérieurs sont largement documentées, les effets de ces changements globaux sur les microorganismes (micro-eucaryotes, bactéries et archées) ne sont généralement pas ou peu abordés. Ces organismes microscopiques représentent toutefois une richesse importante ($1,2 \times 10^{30}$ cellules pour les procaryotes à l'échelle du globe) et une diversité clé permettant d'assurer de nombreux processus biogéochimiques et donc le fonctionnement des écosystèmes. Leur participation au cycle du carbone dans les écosystèmes aquatiques notamment, via la fixation de CO₂ (i.e. photosynthèse microbienne) ou l'émission de différents gaz à effets de serre (i.e. respiration microbienne) est modulée par les conditions climatiques/environnementales et l'enrichissement trophique (nutriments transférés des bassins versants) des systèmes aquatiques. Dans les écosystèmes lacustres, comprendre l'impact de l'anthropisation sur les communautés microbiennes est un enjeu majeur des recherches scientifiques, actuelles et à venir, puisque des modifications de la diversité et donc des fonctions associées supportées par ces microorganismes affecteront, théoriquement, la résilience des écosystèmes et de l'ensemble des organismes

qu'ils abritent, ainsi que de la capacité de ces milieux à résister aux changements globaux actuels et futurs. Afin d'identifier et de quantifier les modifications des communautés microbiennes sous divers forçages climatiques et anthropiques et ainsi prédire l'évolution fonctionnelle des écosystèmes lacustres, il est possible de se placer dans le cadre d'une approche de rétro-observation. La reconstitution de l'évolution à long terme des conditions environnementales et des communautés biologiques passées peut offrir des éléments afin de prédire comment des changements environnementaux futurs affecteront le fonctionnement des écosystèmes aquatiques et la diversité biologique de ces milieux. Ainsi, les archives environnementales naturelles que sont les sédiments lacustres présentent un intérêt particulier de par leur vaste répartition géographique, combinée à un large éventail de contextes typologiques, hydrologiques et chimiques différents permettant de développer des études portant sur diverses questions écologiques. Ces sédiments lacustres enregistrent et archivent les conditions environnementales locales (végétation, utilisation des sols, communautés aquatiques, transferts et accumulations de nutriments et de polluants) et globales (pollutions atmosphériques et conditions climatiques). Le compartiment sédimentaire est un puissant intégrateur fonctionnel, spatial et temporel de la dynamique des écosystèmes afin de déterminer dans quelle mesure les conditions environnementales passées ont contrôlé au fil du temps, et contrôlent encore aujourd'hui, la diversité des microorganismes et les fonctions écologiques associées. L'étude du matériel génomique subfossile préservé dans ces sédiments lacustres est actuellement l'un des axes de développement les plus prometteurs en écologie, la génomique subfossile élargissant la palette des informations biologiques disponibles. Des approches ciblant l'ADN sédimentaire ancien (sedaDNA) ont déjà été appliquées sur des sédiments lacustres pour reconstituer la diversité passée des micro-eucaryotes, mais très peu pour les communautés d'archées et de bactéries (mis à part pour les cyanobactéries). Cependant, des travaux récents sur l'ADN subfossile microbien suggèrent qu'ils constituent des indicateurs précieux pour reconstituer les modifications climatiques ayant affecté les environnements passés et pour étudier le rôle des sources de matière organique dans les patrons de diversité microbienne lacustre. L'utilisation des approches ciblant le sedaDNA pour reconstituer la diversité microbienne passée à partir des archives lacustres nécessite toutefois des précautions spécifiques, qu'il s'agisse de questions de contaminations, de préservation du matériel génomique ou de présence dans l'archive sédimentaire de populations microbiennes actives. A l'heure actuelle, des approches métagénomiques couplées à des traitements bioinformatiques permettent d'évaluer des profils de dommages causés à l'ADN (notamment des désaminations de cytosine) afin d'évaluer si les ADN extraits représentent des ADN authentiquement anciens. Néanmoins ces approches nouvelles ne permettent pas à l'heure actuelle de cribler un grand nombre d'échantillons, ni même d'évaluer la fraction microbienne active, qui nécessiterait la mise en œuvre d'approches de métatranscriptomique. A l'opposé, le séquençage d'amplicons offre la possibilité de séquencer un grand nombre d'échantillons et de décrire de façon exhaustive la diversité des micro-organismes. Dans ce dernier cas, la distinction des populations microbiennes archivées des populations métaboliquement actives dans le sédiment nécessite de ne pas uniquement appliquer l'approche de metabarcoding sur de l'ADN, mais également sur les ARN (transcrits) afin de déchiffrer quels sont les organismes actifs des taxa archivés. Ce type d'approche, appliquée avec succès dans les sols, les milieux aquatiques et des sédiments lacustres de surface, est prometteuse pour évaluer les réarrangements de la communauté microbienne à large échelle temporelle.

Objectifs et hypothèses Dans ce contexte, le projet mobilisera le potentiel de reconstruction des communautés de micro-eucaryotes, archées et bactéries via des approches de metabarcoding appliquées aux archives sédimentaires lacustres pour (i) reconstituer les communautés présentes dans l'archivage sédimentaire correspondant à de longues périodes temporelles (durant l'Holocène et le Tardiglaciaire) ; (ii) distinguer les communautés présentes et les communautés actives par une approche combinée ADN et ARN; (iii) d'identifier l'impact relatif des conditions édaphiques et des changements de facteurs environnementaux sur les patrons de diversité microbienne ; Les hypothèses de travail de ce projet de thèse sont donc : - (i) qu'à l'échelle des bassins versants de lacs de tailles modérée, les communautés microbiennes des sols sont distinctes des communautés aquatiques, et sont transférées dans les écosystèmes lacustres puis archivées dans les sédiments. Comme ces communautés sont spécifiques aux différents écosystèmes terrestres et aux différentes pratiques d'usages des sols, elles peuvent compléter la représentation des changements locaux d'usages des sols et des pratiques anthropiques obtenus à l'aide d'indicateurs paléo-écologiques classiques (sédimentologie, palynologie, ...) ; - (ii) que les différentes sources de matière organique seront marquées par des changements taxonomiques dans les communautés microbiennes, certains taxa (par exemple, les cyanobactéries) étant spécifiques à la production massive de MO interne, tandis que d'autres (i.e. Bacteroides, Enterococcus, Escherichia) sont associés à une contamination fécale, suggérant un apport de matière organique et d'éléments nutritifs du bassin versant. Ceci sera ensuite comparé aux paramètres sédimentologiques classiques caractérisant la matière organique (rapport C/N, teneur en carbone organique, $\delta^{13}C$) et à d'autres indicateurs biologiques de contamination fécale (ascospores champignons coprophiles) ; - (iii) que la modification de la diversité microbienne globale peut être comparée aux principales périodes de modification environnementales (composition de la végétation, utilisation des sols, processus d'eutrophisation) précédemment identifiées sur les séquences sédimentaires, afin de déterminer si les patrons de diversité globale associés à ces facteurs sont transitoires ou profondément modifiés (concept de résilience). Les périodes chronologiques du début de l'Holocène (avant la période du Néolithique ; de 11 800 à 7000 cal. BP) et du Tardiglaciaire (de 11 800 à 7000 cal. BP) serviront d'état de référence pour la dynamique de la diversité microbienne sous forçage climatique, avant la

mise en place des forçages anthropiques sur les écosystèmes. Caractères innovants Les aspects innovants de ce sujet sont liés aux objectifs scientifiques ciblés. En effet (i) les sédiments aquatiques sont un compartiment clé de l'écologie microbienne où les micro-organismes bactériens et archéens sont souvent considérés, mais très peu de recherches simultanées des deux domaines de la vie, et dans ce contexte paléo-limnologique ont été consacrées à ces micro-organismes ; (ii) enfin, la comparaison de la diversité microbienne présente (ADN) et active (ARN) provenant des mêmes échantillons offrira à la communauté un travail de référence afin d'établir le potentiel des analyses d'ADN et d'ARN microbiens subfossiles dans les archives sédimentaires. Sites d'études, méthodologie et sorties envisagées Les 3 lacs étudiés (Moras, Paladru et la Thuile) sont actuellement soumis à des processus d'eutrophisation, les lacs de Moras et Paladru étant actuellement dans un état eutrophe, et le lac de La Thuile dans un état oligotrophe. Ces 3 lacs ont fait l'objet d'études paléo-environnementales couvrant l'ensemble du Tardiglaciaire et de l'Holocène ; les contrôles chronologiques (modèle âge-profondeur) sont déjà établis et de nombreux indicateurs paléo-écologiques sont disponibles (pollen, charbon de bois, restes de champignons, analyses sédimentologique). Le contrôle chronologique sera complété par des mesures des éléments radioactifs (^{210}Pb , ^{137}Cs , ^{241}Am) pour les périodes récentes. Cette thèse sera organisée en 3 tâches : (1) une phase d'échantillonnage sédimentaire des 3 lacs couvrant les périodes du Tardiglaciaire et de l'Holocène au cours de laquelle seront sous-échantillonnés les sédiments destinés aux analyses moléculaires, (2) une phase expérimentale au cours de laquelle les ARN seront rétrotranscrits en ADNc avant la préparation des bibliothèques d'amplicons. Pour chacun des échantillons, ADN et ADNc, des amorces spécifiques des gènes d'ADNr 16S Archées, ADNr 16S Bactéries et ADNr 18S Eucaryotes permettront les amplifications des marqueurs ribosomiques des communautés microbiennes des trois domaines de la vie, (3) une phase d'analyse bioinformatique où les séquences obtenues seront regroupées en OTUs puis affiliées taxonomiquement contre des bases de référence, et (4) une phase d'analyse et de comparaison biostatistique afin d'évaluer richesse, diversité, composition taxonomique, analyses de diversité beta, et analyses statistiques multi-variées afin de comprendre quels paramètres environnementaux pilotent l'établissement des communautés et lesquels sont susceptibles de conditionner l'activité de celles-ci. La hiérarchie des forçages impliqués dans la réponse de ces systèmes sera abordée à l'aide d'outils de modélisation statistique (modèles GAM ou REML) qui permettront de préciser la structure de covariance et d'estimer les maximums de vraisemblance dans les corrélations établies entre les différents paramètres. Les résultats obtenus seront valorisés autour de trois « axes » principaux : - la combinaison, sur les mêmes échantillons, du séquençage des communautés actives (ARN) et totales (ADN) devrait nous permettre de discriminer les taxa devant être considérés comme actifs de ceux qui peuvent être envisagés comme des communautés reliques et donc potentiellement utilisables dans le cadre de travaux paléo-limnologiques. - identifier les patrons de diversité et cibler les taxa spécifiques selon des aspects climatiques et de dynamiques environnementales locales au cours du Tardiglaciaire et de l'Holocène. Pour les périodes sans forçage anthropique, les modifications des patrons de diversité des micro-organismes pourraient confirmer la capacité de certains taxons spécifiques pour retracer des modifications climatiques locales. De même pour les grands périodes d'anthropisation du bassin versant précédemment identifiées sur ces sites. - la capacité, via la reconstitution des communautés archées et bactériennes, à déterminer les modifications des sources de matière organique dans leur abondance et leur temporalité seront de nouveaux éléments pour déterminer si l'état écologique de ces systèmes lacustres est lié à des processus écologiques hérités (antiques/médiévaux) ou plus « contemporains » (post Petit Age Glaciaire). Références - Ariztegui D et al. (2015) Present and future of subsurface biosphere studies in lacustrine sediments through scientific drilling. *Int J Earth Sci* 104, 1655-1665, 10.1007/s00531-015-1148-4. - Biddle JF et al. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 3846-3851, 10.1073/pnas.0600035103. - Birrer SC et al. (2018) Interactive effects of multiple stressors revealed by sequencing total (DNA) and active (RNA) components of experimental sediment microbial communities. *Sci Total Environ*, 10.1016/j.scitotenv.2018.05.065. - Broman E et al. (2017) Oxygenation of hypoxic coastal baltic sea sediments impacts on chemistry, microbial community composition, and metabolism. *Front Microbiol* 8, 2453, 10.3389/fmicb.2017.02453. - Carini P et al. (2016) Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nat Microbiol* 2, 1-6. nmicrobiol.2016.242. - Capo E et al. (2016) Long-term dynamics in microbial eukaryotes communities: a paleolimnological view based on sedimentary DNA. *Mol Ecol*, 25(23):5925-5943, 10.1111/mec.13893. - Capo E et al. (2017) Tracking a century of changes in microbial eukaryotic diversity in lakes driven by nutrient enrichment and climate warming. *Environ Microbiol* 19: 2873-2892, 10.1111/1462-2920.13815. - D'Hondt S et al. (2004) Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. *Science* 306, 2216-2221, 10.1126/science.1101155. - Domaizon I et al. (2017) DNA-based methods in paleolimnology: new opportunities for investigating long-term dynamics of lacustrine biodiversity. *J Paleolimnol* 58, 1-21, 10.1007/s10933-017-9958-y. - Ficetola GF et al. (2018) DNA from lake sediments reveals long-term ecosystem changes after a biological invasion. *Science Advances* 4: eaar 4292, 10.1126/sciadv.aar4292. - Hou W et al. (2014) Identification of photosynthetic plankton communities using sedimentary ancient DNA and their response to late-Holocene climate change on the Tibetan Plateau. *Sci Rep* 17, 6648, 10.1038/srep06648. - Vuillemin A et al. (2016) Recording of climate and diagenesis through sedimentary DNA and fossil pigments at Laguna Potrok Aike, Argentina. *Biogeosciences* 13, 2475-2492, 10.5194/bg-13-2475-2016. - Vuillemin A et al. (2018) Microbial community composition along a 50 000-year lacustrine sediment sequence. *FEMS Microbiol Ecol* 94, 4, 10.1093/femsec/fiy029.

6. CANDIDAT RECHERCHE

Le candidat devra : - présenter d'excellents résultats universitaires, - posséder une solide formation en écologie microbienne, ou en biologie moléculaire et écologie théorique, - démontrer un intérêt pour les approches moléculaires et l'analyse de données (dont l'utilisation de modèles statistiques), - montrer un intérêt envers les questions paléo-environnementales (le laboratoire d'accueil pouvant assurer la formation nécessaire aux travaux de thèse), - faire état d'une grande curiosité scientifique afin d'appréhender l'aspect pluridisciplinaire du sujet.

7. FINANCEMENT DE LA THESE : *Le contrat doctoral fixe une rémunération principale, indexée sur l'évolution des rémunérations de la fonction publique : depuis le 1er février 2017, elle s'élève à 1768,55 euros bruts mensuels pour une activité de recherche seule. Des heures d'enseignements peuvent être effectuées dans la limite de 64 heures équivalent TD par année universitaire après autorisation du président de l'université et rémunérées au taux fixé pour les travaux dirigés en vigueur. D'autres activités complémentaires au contrat doctoral sont prévues par l'article 5 du décret n° 2009-464 du 23 avril 2009 modifié. La durée totale des activités complémentaires aux activités de recherche confiées au doctorant dans le cadre du contrat doctoral ne peut excéder un sixième du temps de travail annuel.*