



marine  
biodiversity  
exploitation  
& conservation

# Création d'un protocole de mesure du méthane sur le microbiote intestinal



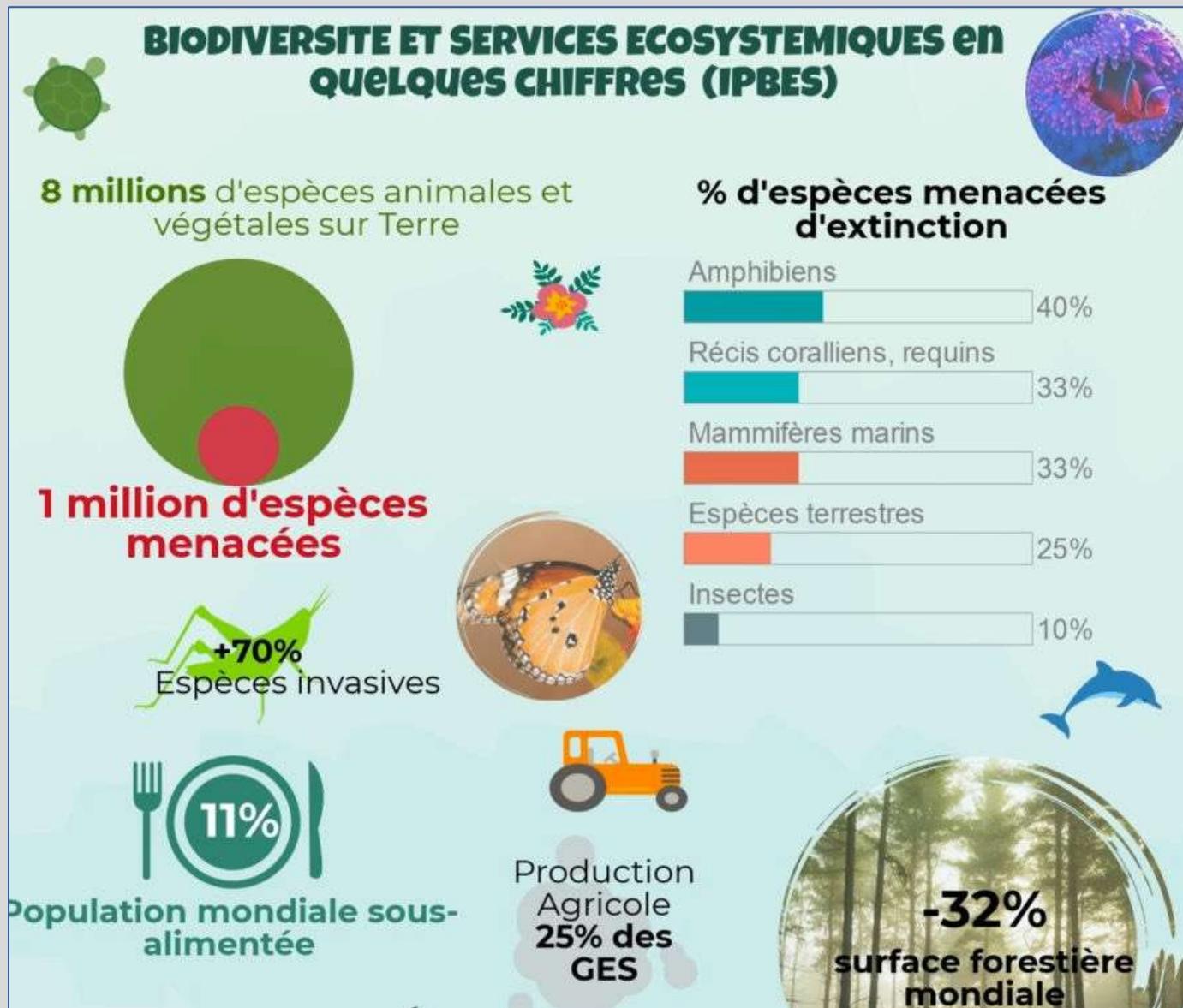
Martin DESSART

Unité Mixte de Recherche Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation

Sous la direction de Jean-Christophe Auguet (CNRS) et Marie-Charlotte Cheutin (CNRS)

# Contexte

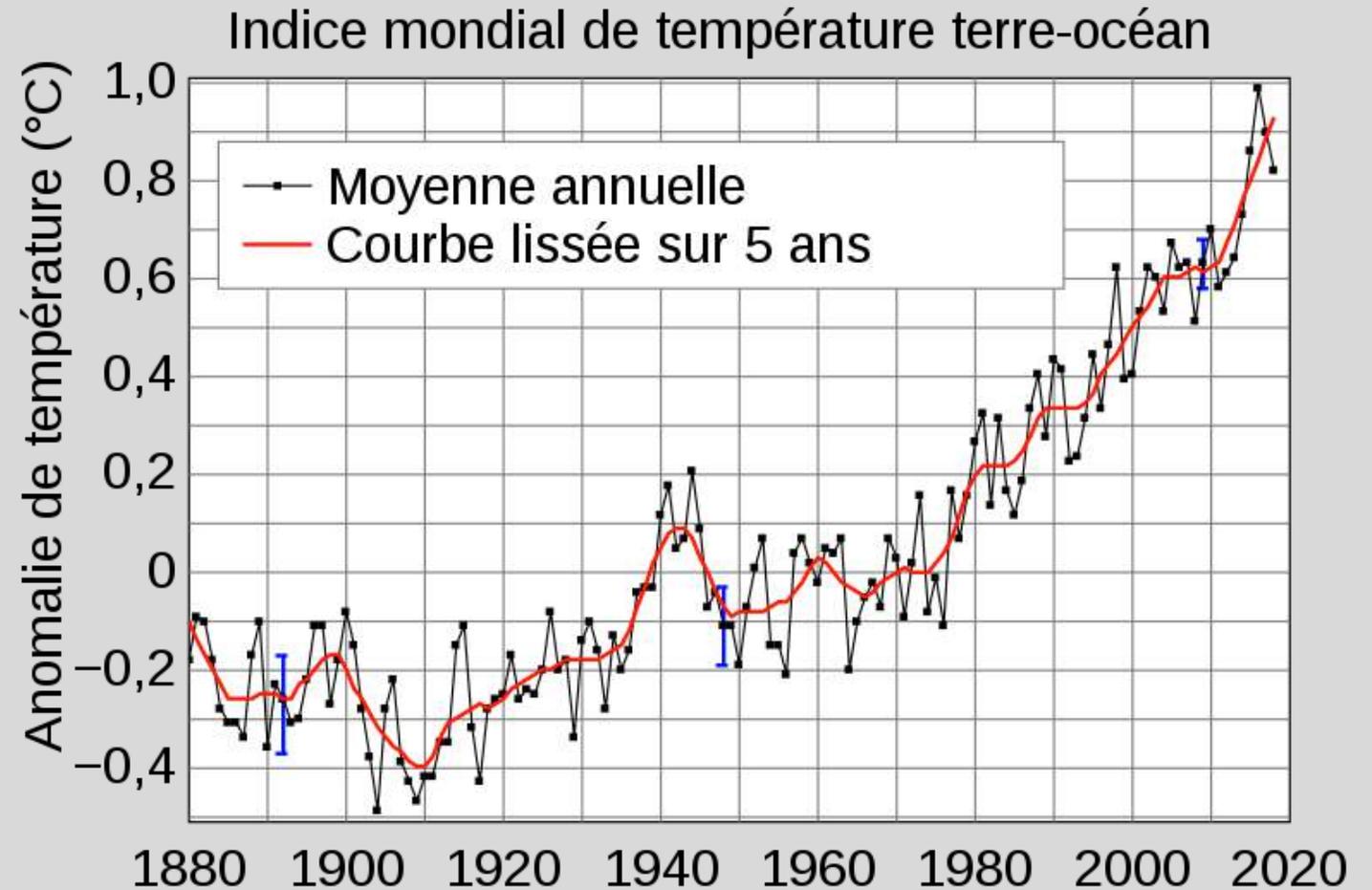
- IPBES : 29 avril – 4 mai 2019
- 5 facteurs majeurs
- GIEC – depuis 1950





# Contexte

- IPBES : 29 avril – 4 mai 2019
- 5 facteurs majeurs
- GIEC – depuis 1950
- Anomalies de température



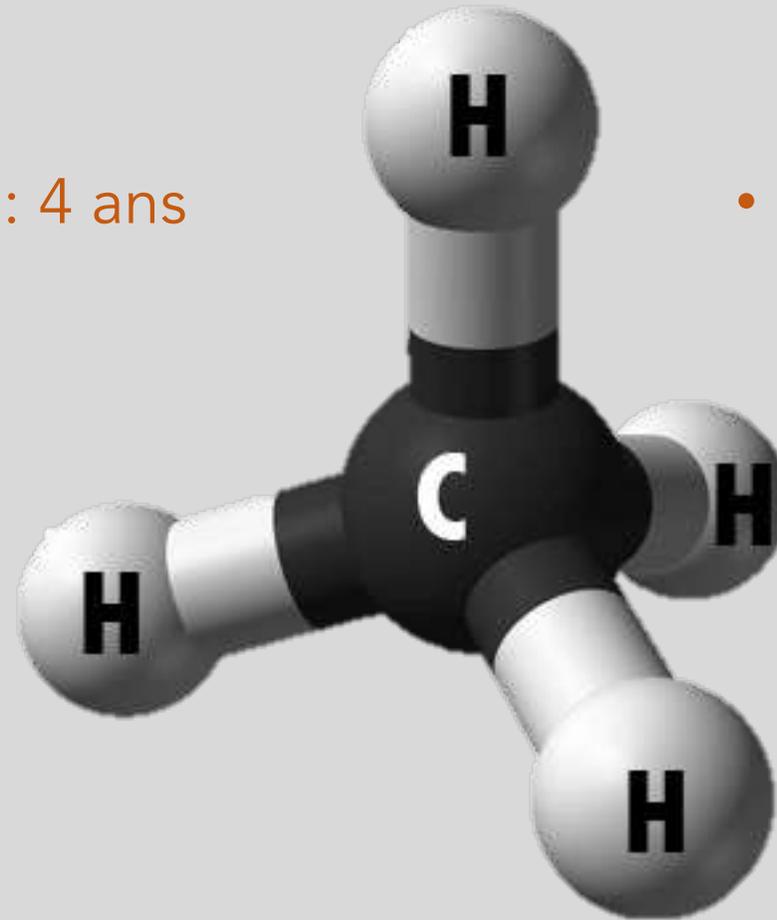


# Contexte

- Méthane
- Degradé par radicaux OH·

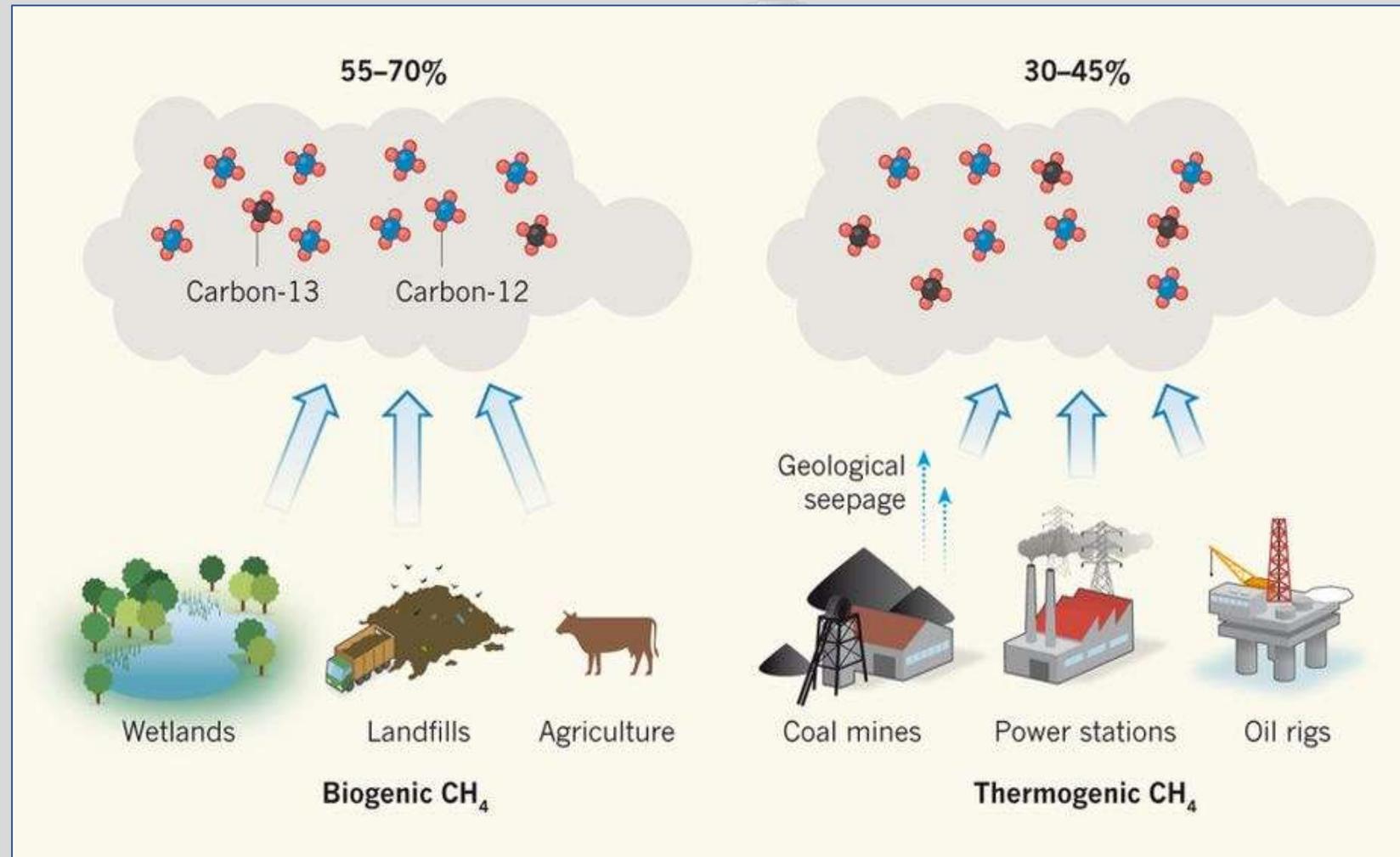
- $\frac{1}{2}$  vie : 4 ans

- PRG: 28



# Contexte

- Méthane
- Degradé par radicaux OH·
- Source thermogénique
- Source biogénique

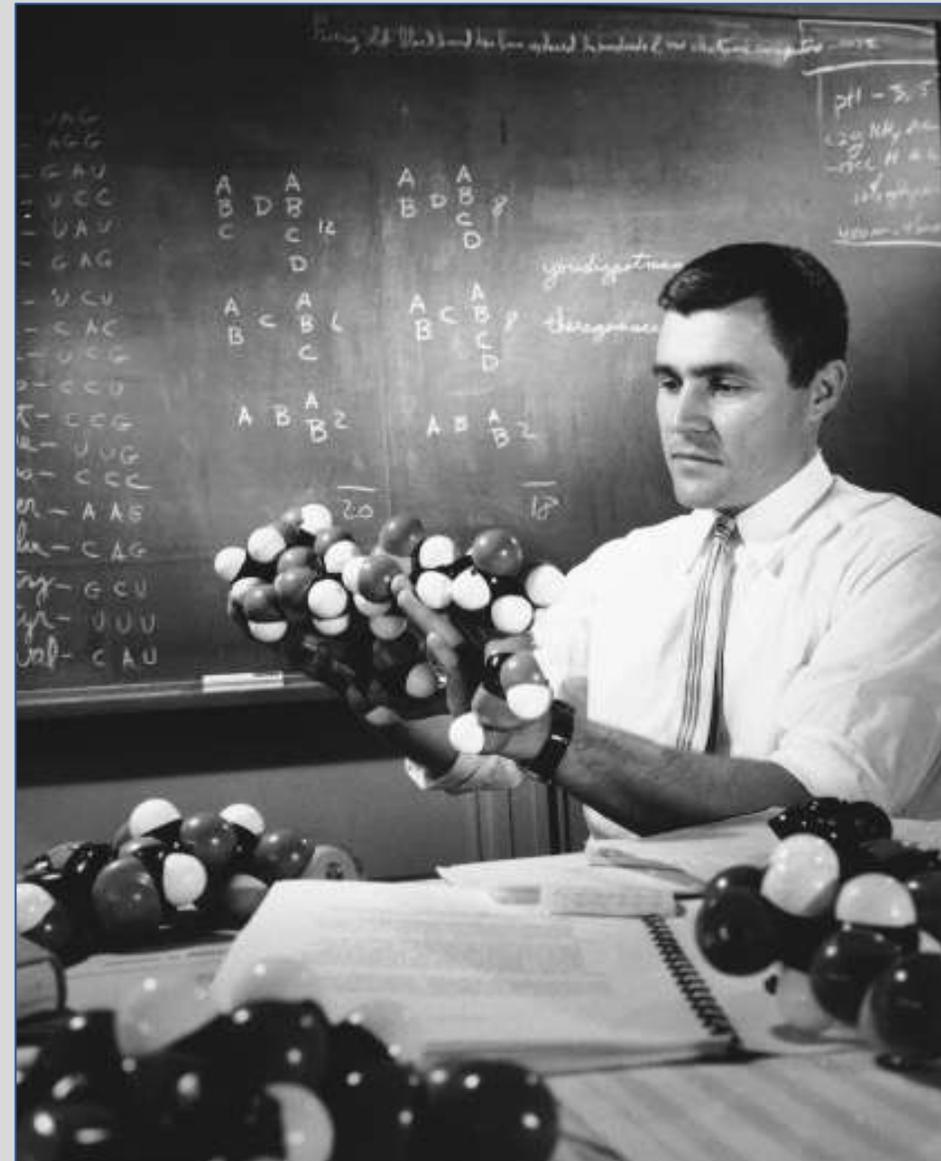


Allen 2016: Rebalancing the global methane budget



# Contexte

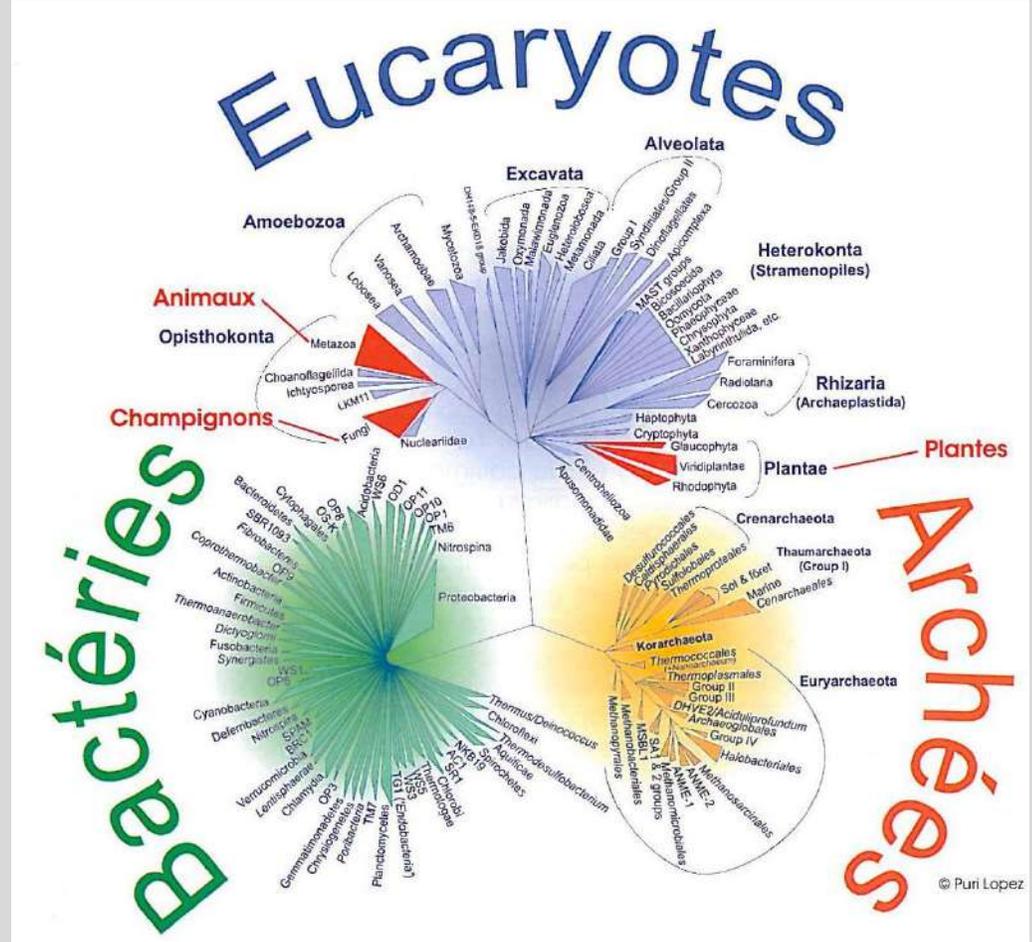
- C. Woese – 1977 ARNr16S



Woese with an RNA model at G.E. in 1961. Associated Press.

# Contexte

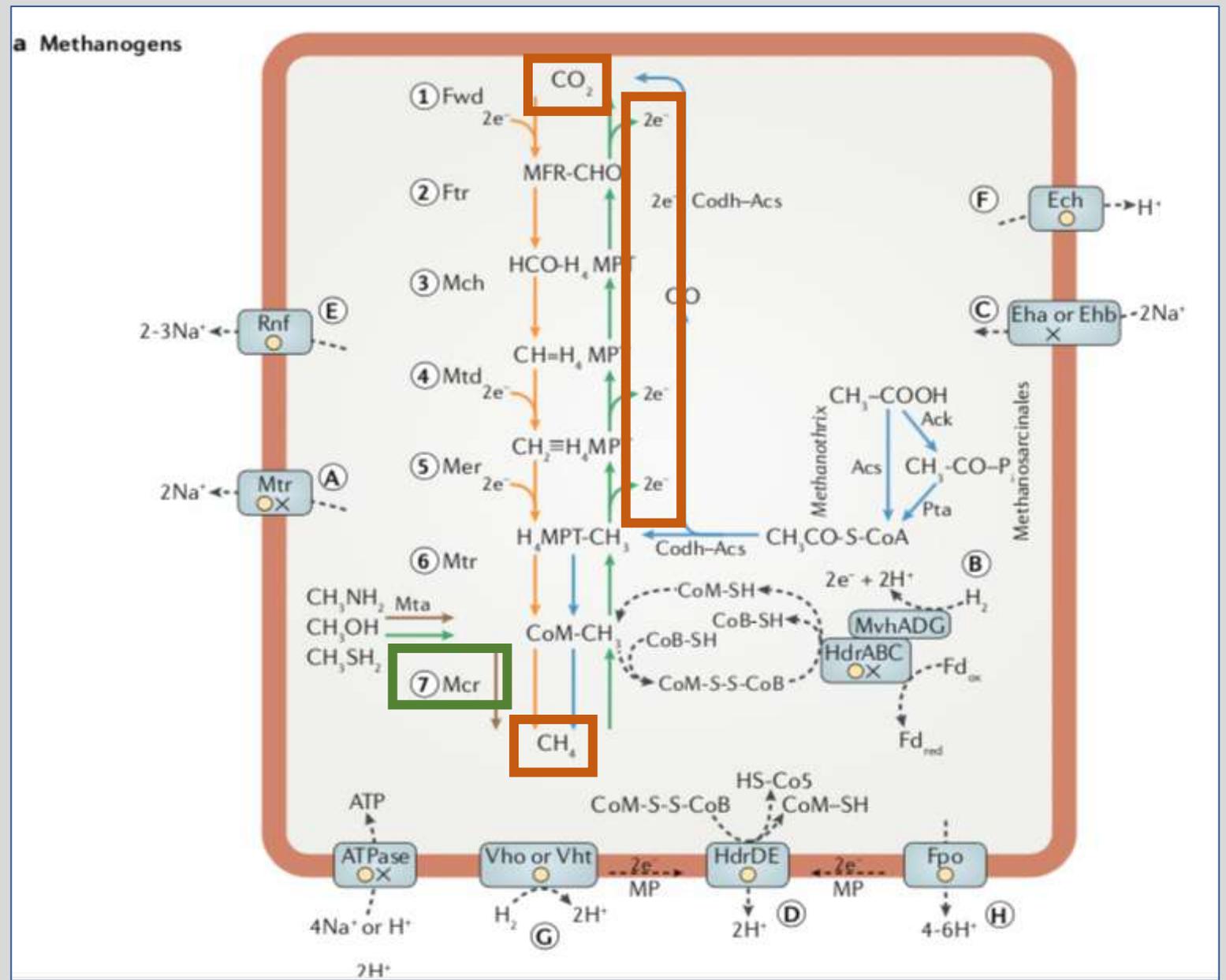
- C. Woese – 1977 ARNr16S
- Procaryotes
- Métabolisme unique



Arbol Filogenético © Purification Lopez Garcia

# Contexte

- C. Woese – 1977 ARNr16S
- Procaryotes
- Métabolisme unique

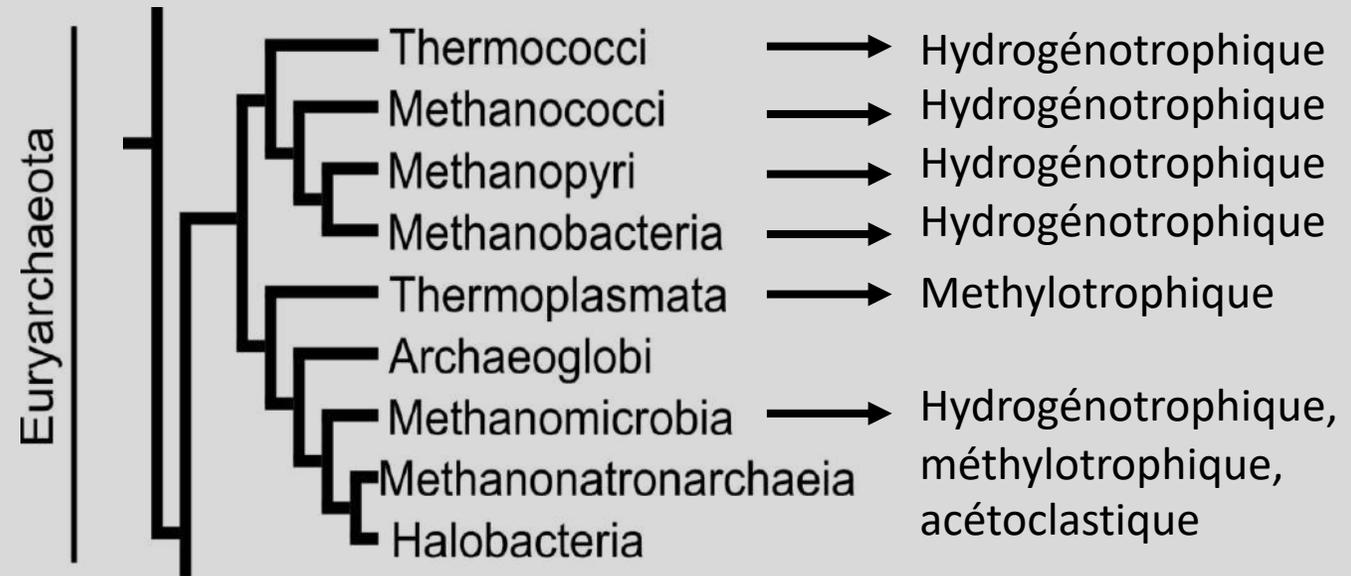


Evans et al 2019 : An evolving view of methane metabolism



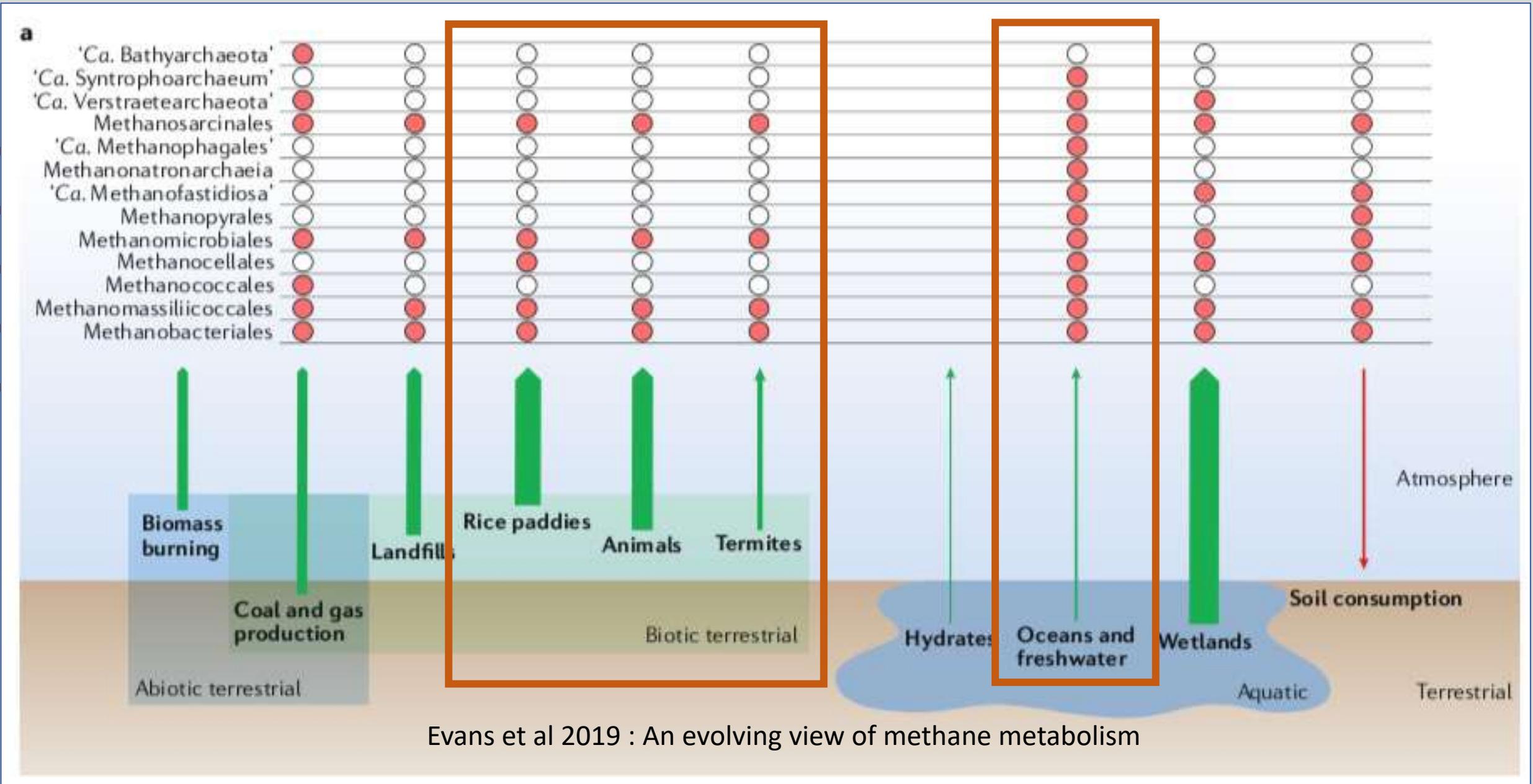
# Contexte

- C. Woese – 1977 ARNr16S
- Procaryotes
- Métabolisme unique
- Méthanogènes



E. F. DeLong et al 2001 : Environmental diversity of bacteria and archaea

Evans et al 2019 : An evolving view of methane metabolism

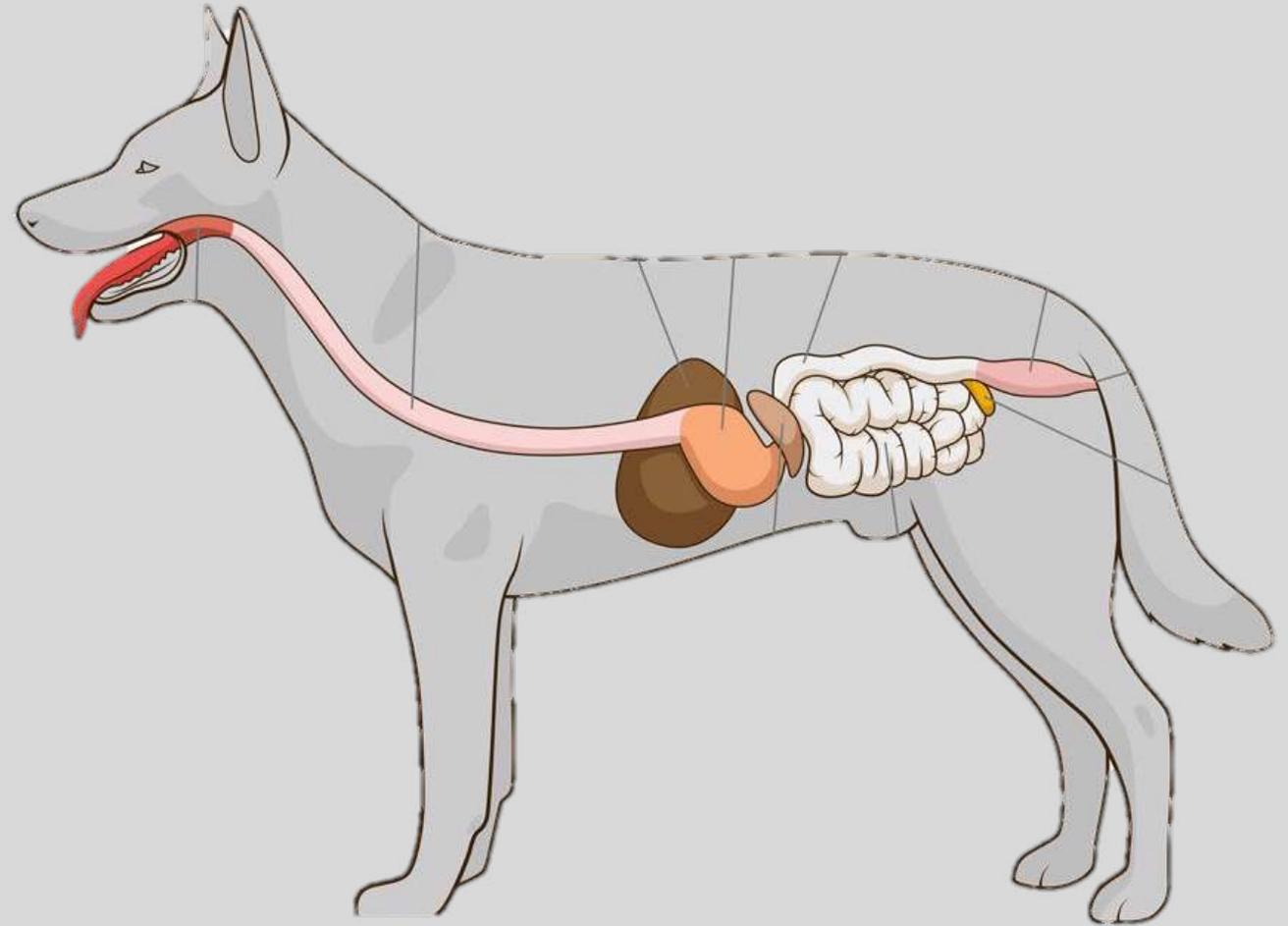


Evans et al 2019 : An evolving view of methane metabolism



# Contexte

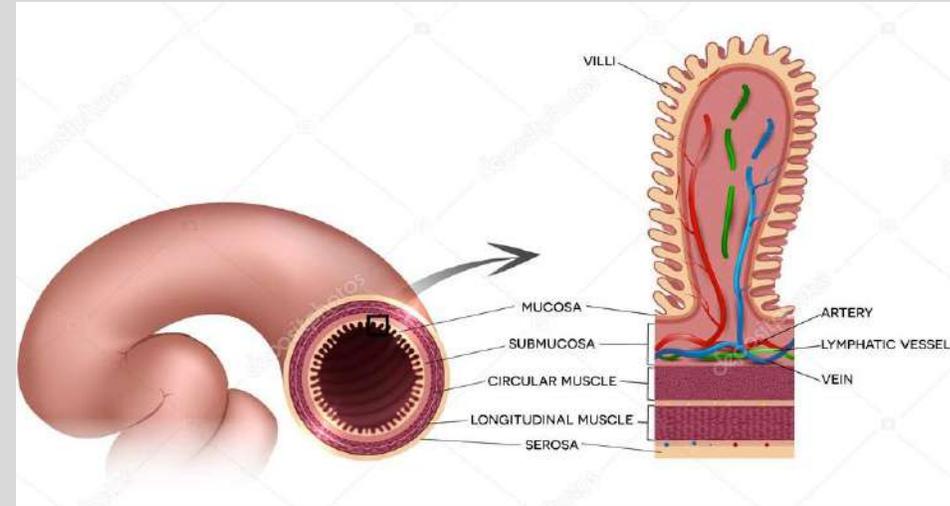
- Tractus intestinal





# Contexte

- Tractus intestinal
- Surface d'échange

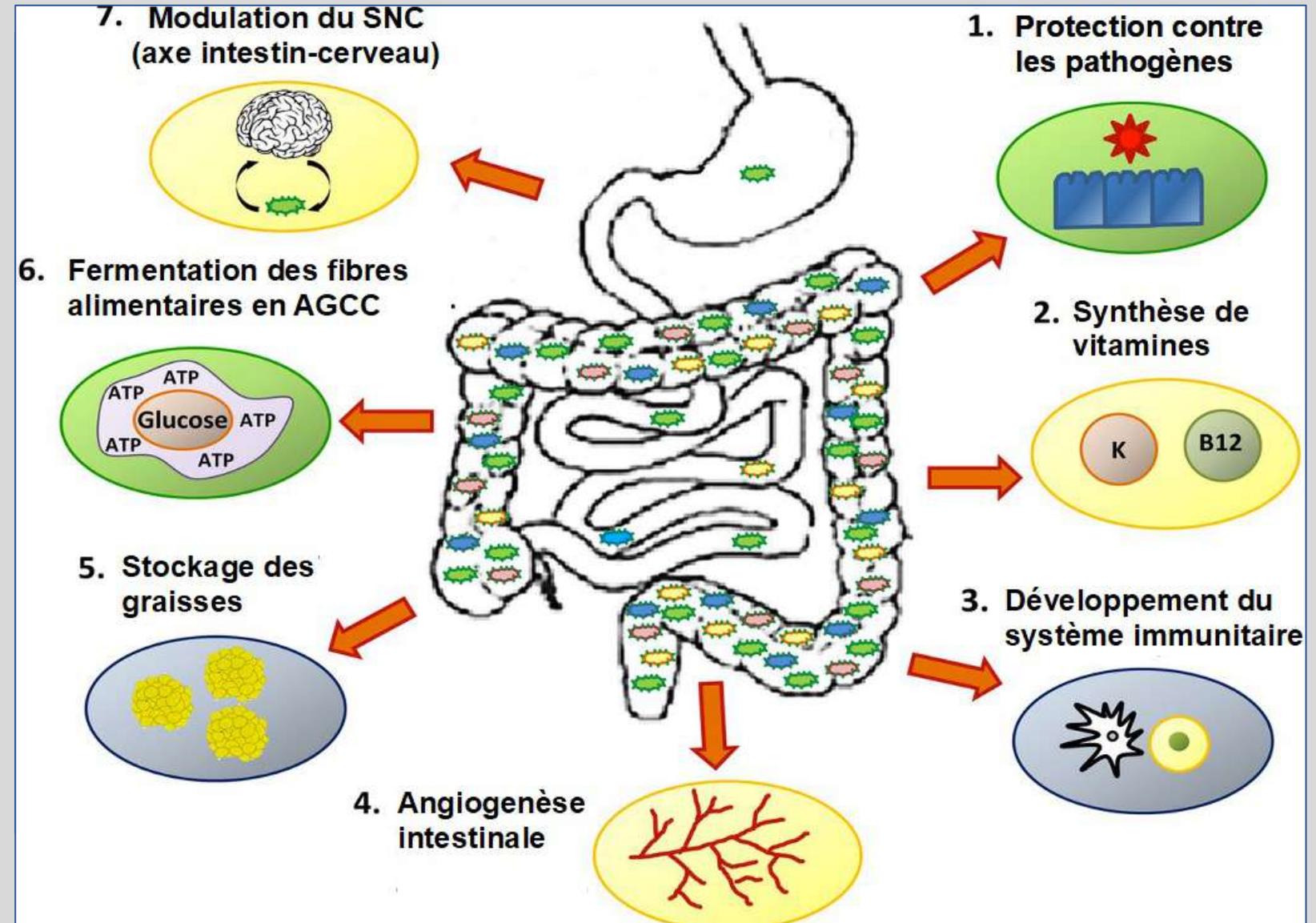


*Université Lille - 2010*



# Contexte

- Tractus intestinal
- Surface d'échange
- Microbiote





# Contexte

- Tractus intestinal
- Surface d'échange
- Microbiote
- Miller et Wolin 1982



*Methanobrevibacter smithii*

## COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL

Plus de 100 000 milliards de micro-organismes habitent notre intestin !

Espèces rares :



*Streptococcus*



*Escherichia coli*



*Enterobacteriaceae*



Espèces dominantes :

*Clostridium*



*Eubacterium*



*Faecalibacterium*



*Bacteroides*



*Bifidodacterium*



Espèces transitoires :

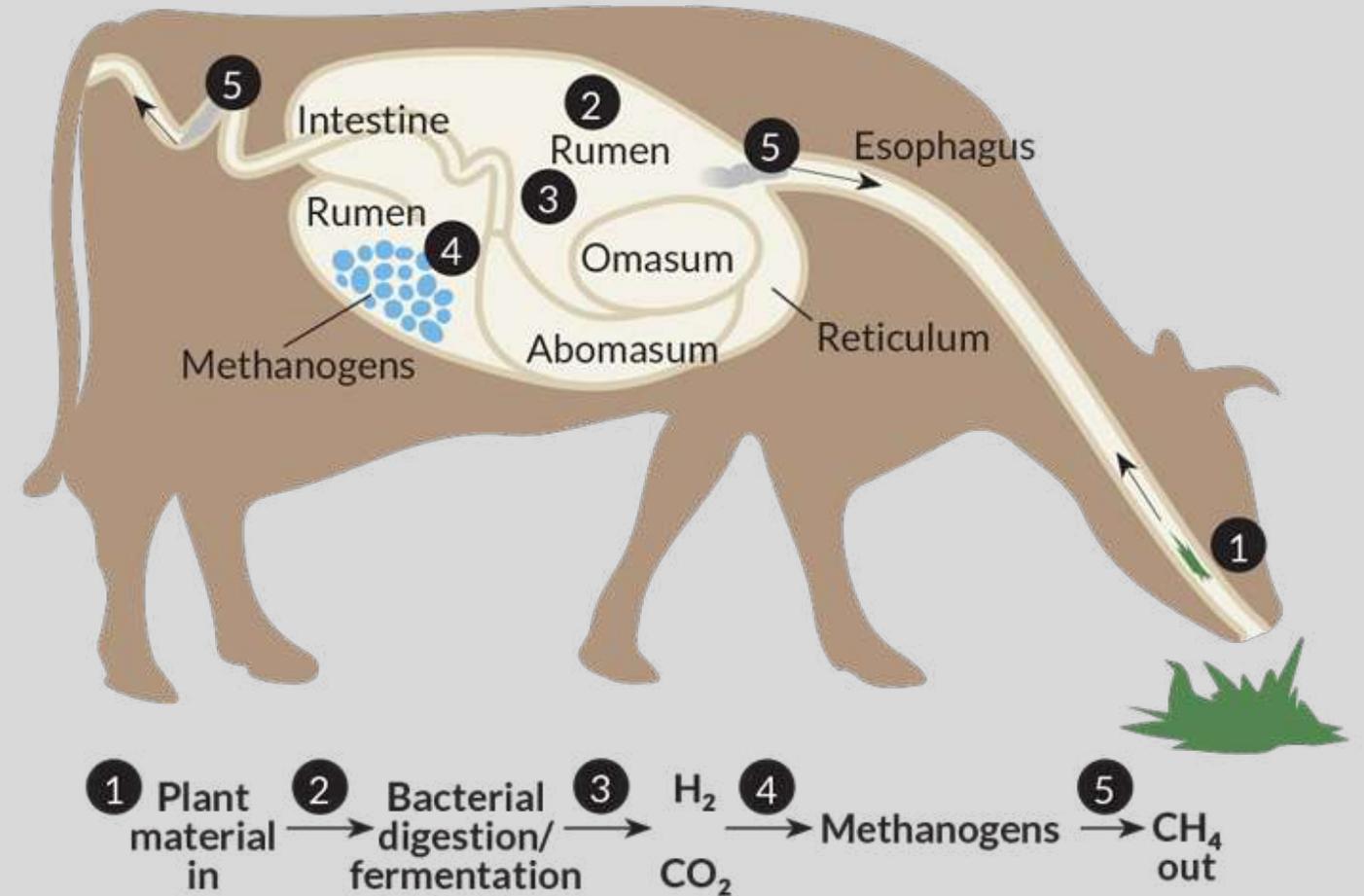


Levures, bactéries lactiques



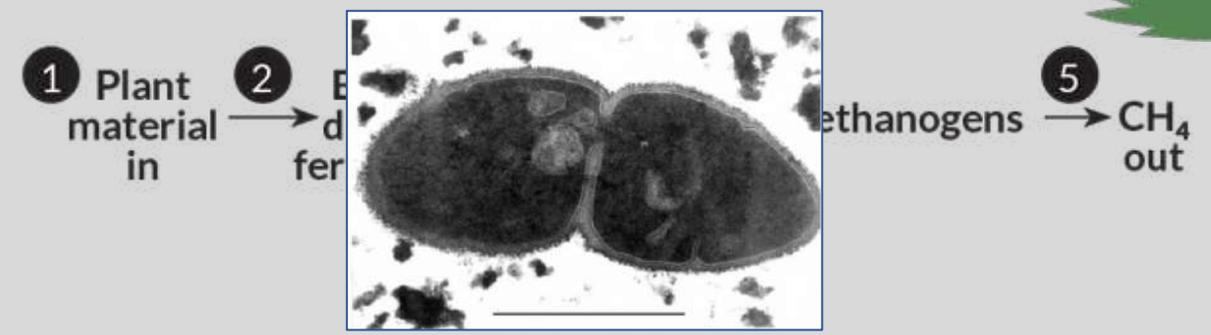
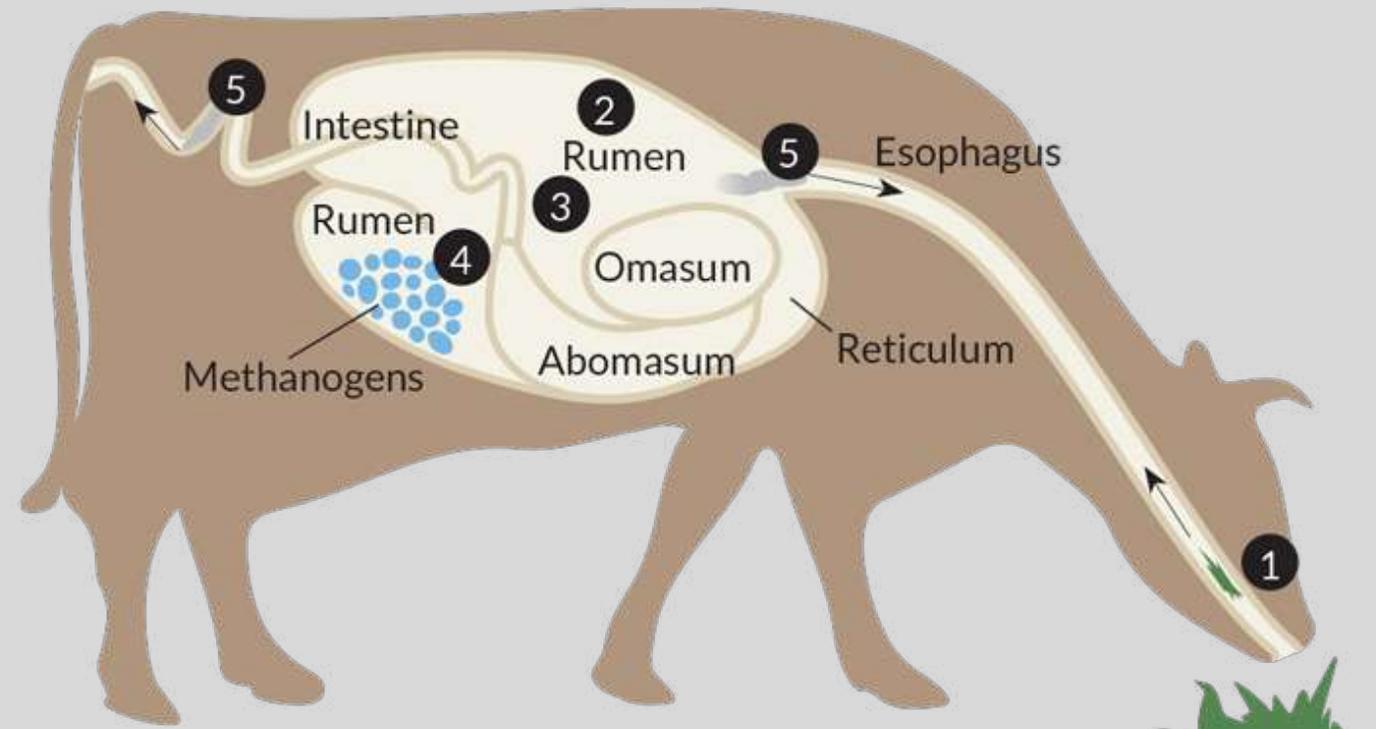
# Contexte

- Tractus intestinal
- Surface d'échange
- Microbiote
- Miller et Wolin 1982
- Chez les ruminants
- Fermentation de bactérie



# Contexte

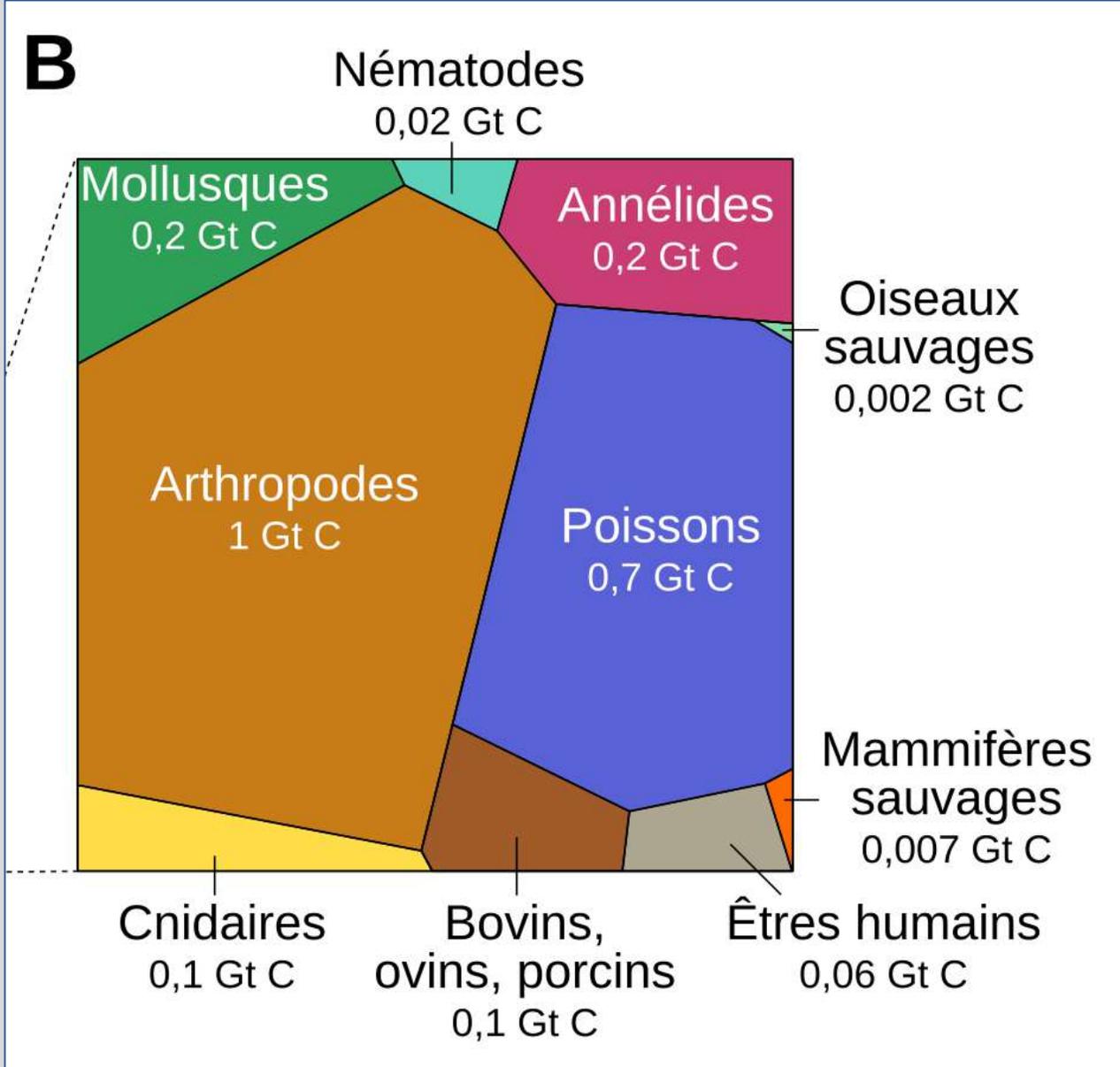
- Tractus intestinal
- Surface d'échange
- Microbiote
- Miller et Wolin 1982
- Chez les ruminants
- Fermentation de bactérie
- 22% source anthropogène



*Methanobacterium ruminantium*

# Contexte

- Distribution biomasse
- Mammifère vs Poissons
- Rôle du microbiote

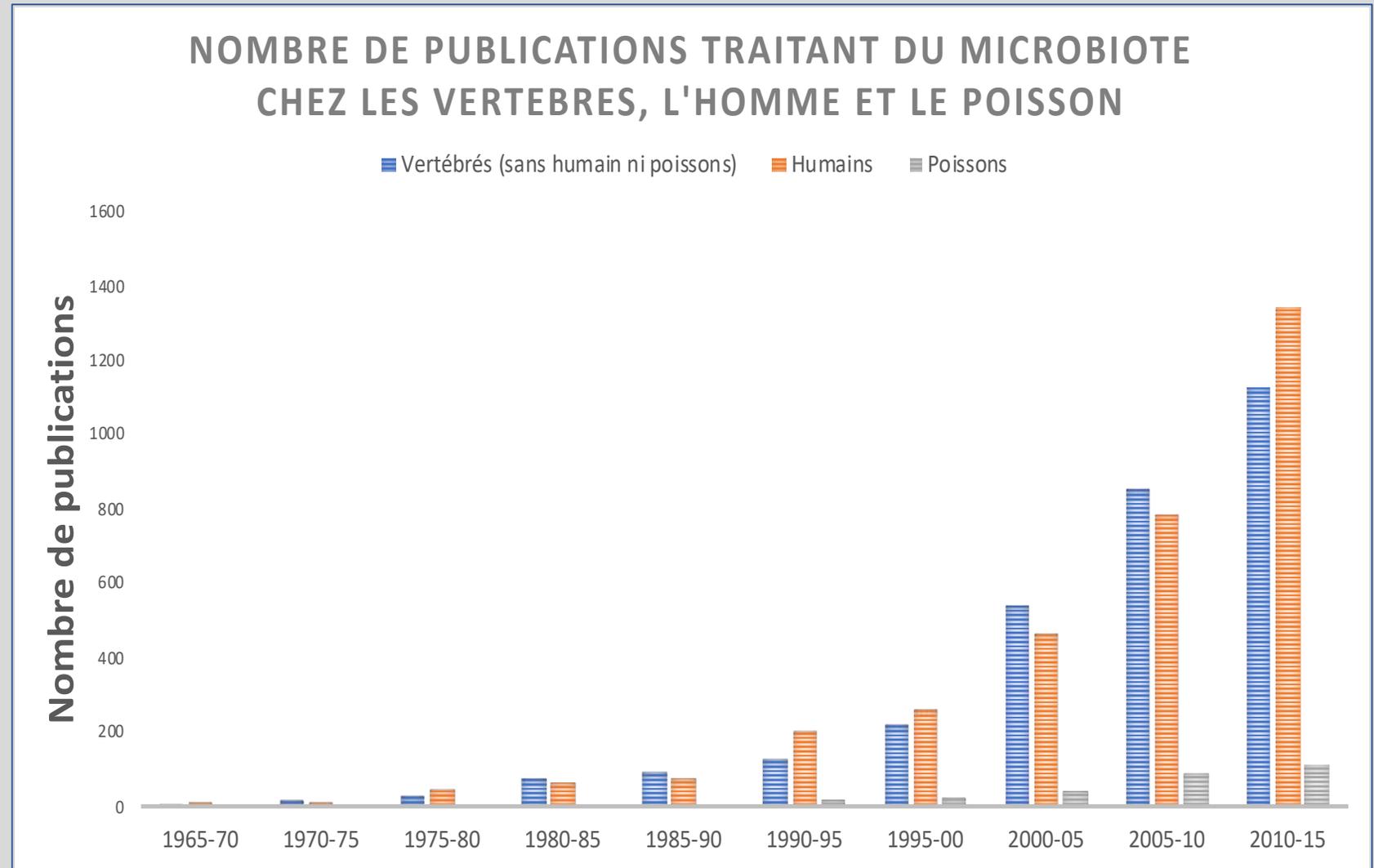


Bar-On et al 2018 : The biomass distribution on earth



# Contexte

- Distribution biomasse
- Mammifère vs Poissons
- Rôle du microbiote
- Service écosystémique :  
Nourriture, recyclage,  
régulation des réseaux  
trophiques
- Rejets CH<sub>4</sub> en milieu  
aquatique mal compris



BMJ 2017 : The role of the microbiome in human health and disease



# Exemple d'étude

- Bonaglia et al. 2017
- Activités de la MF et pression anthropique ?
- Filtration et absorption
- Bioturbation

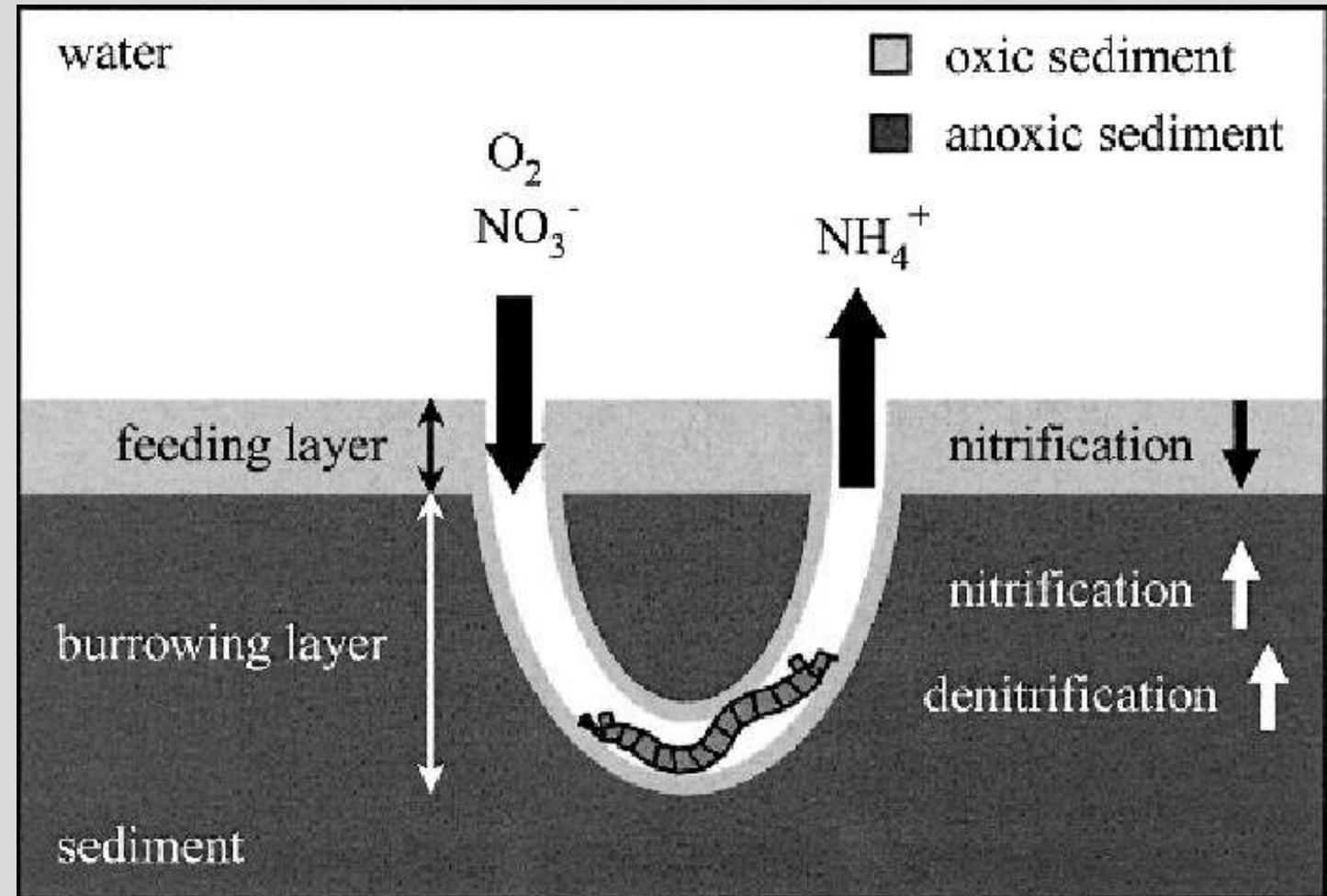


Fig. 1. Conceptual model of the interaction of macrofaunal

Stief et al 2006 : Probing the microenvironment of freshwater sediment macrofauna

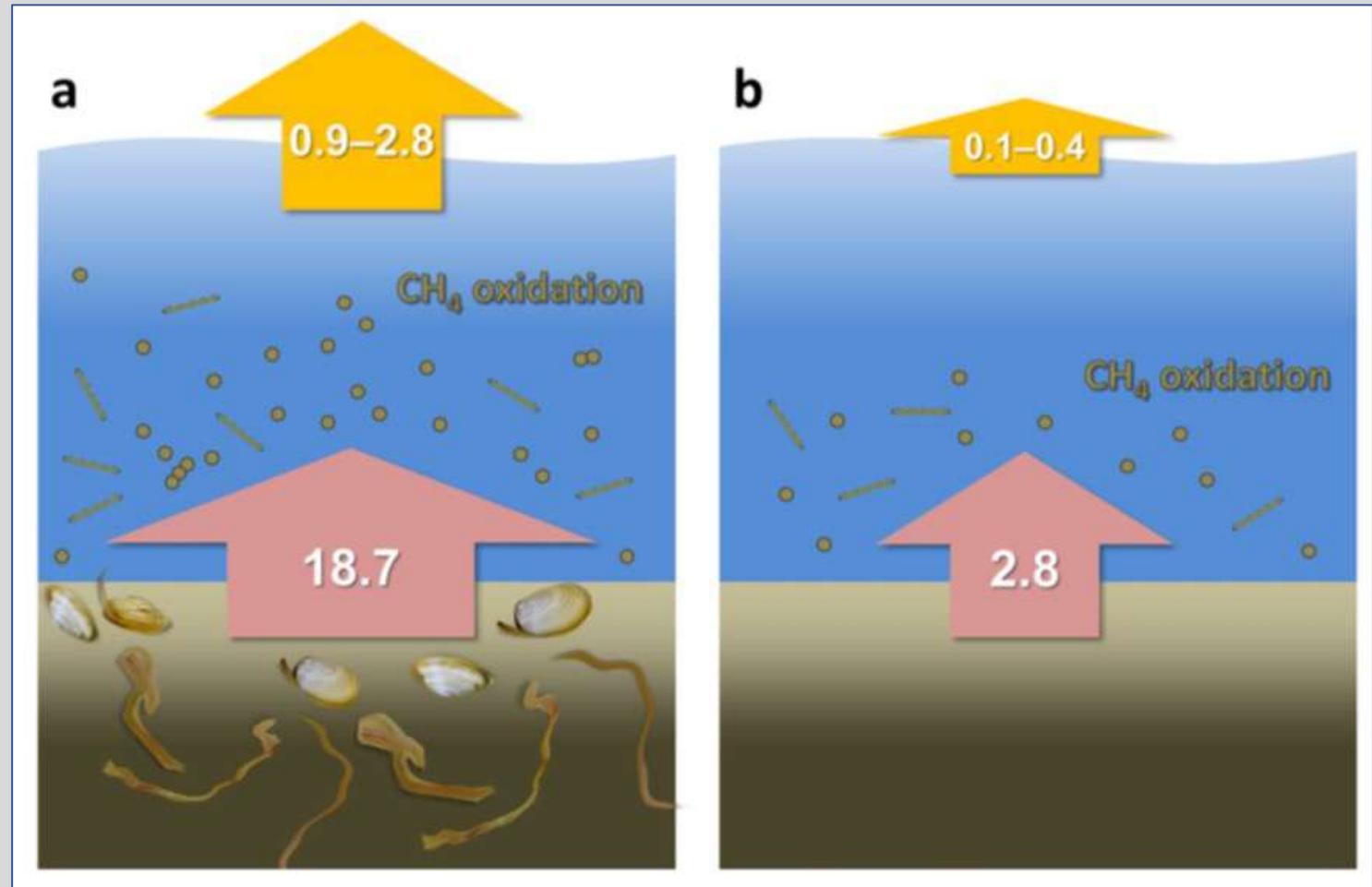




# Exemple d'étude

- 1) Mésocosme : Altération des flux
- 2) Incubation : rejets directs
- 3) Source méthanogènes via mcrA

Conclusion : 10% des émissions de la mer Baltique



**Figure 3.** The influence of macrofauna on benthic methane flux and emission to the atmosphere in the Baltic Sea. Pink arrows depict the benthic fluxes of methane in the current situation with macrofauna (a), and in the scenario of sediments devoid of macrofauna (b). Orange arrows represent estimated emissions of methane to the atmosphere. Benthic fluxes and emissions are expressed in Gg C year<sup>-1</sup>. For more information see the Discussion.



# Problématique:

Thèse (2018 à 2021) : biodiversité microbienne intestinale  
Interaction hôte-symbiote                      Flux de matières et de gaz

Archaea méthanogène

Mesure des flux de  $\text{CH}_4$

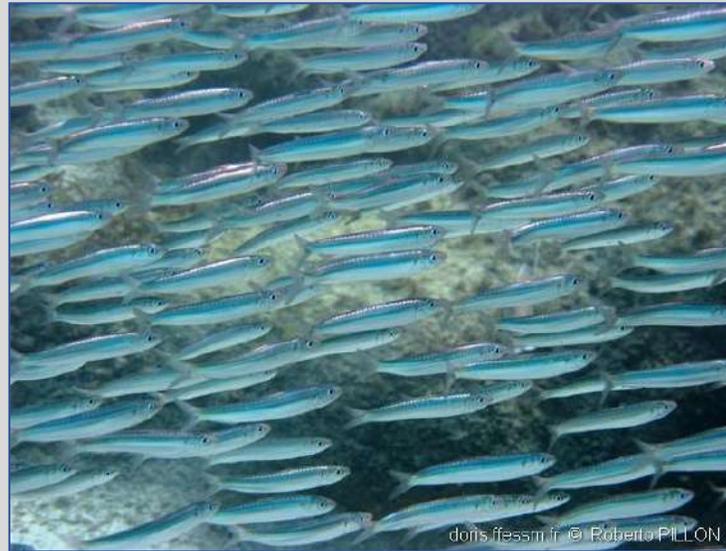
Le microbiote intestinal des poissons contribue-t-il de manière significative à la production globale de  $\text{CH}_4$ ?

Hypothèses : dépendance régime alimentaire :  
Les herbivores rejettent plus de méthane que les carnivores

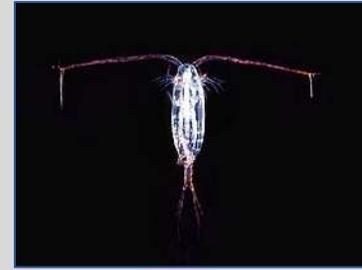
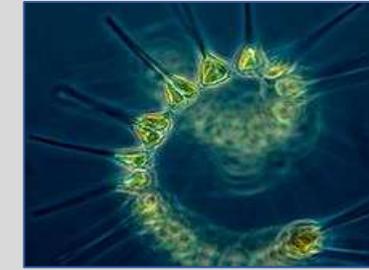


# Modèle biologique

- Sardine, Saupe, Mulet
- Régime alimentaire:
  - Planctonophage
  - Herbivore
  - Détritivore



*Sardina pilchardus*



*Sarpa salpa*



*Mugil cephalus*



# Modèle biologique

- Avantages:
  - Abondance: commun
  -





# Modèle biologique

- Avantages:
  - Abondance: commun
  - Biotope: lagunes et zones côtières
  - Pêche : mars – septembre, avant la reproduction





# Modèle biologique

- Inconvénients:
  - Identification difficile
  -



*Sardina pilchardus*



*Atherina presbyter*



*Mugil cephalus*



*Liza aurata*



# Modèle biologique

- Inconvénients:
  - Identification difficile
  - Techniques de pêche
  - Impact de la météo

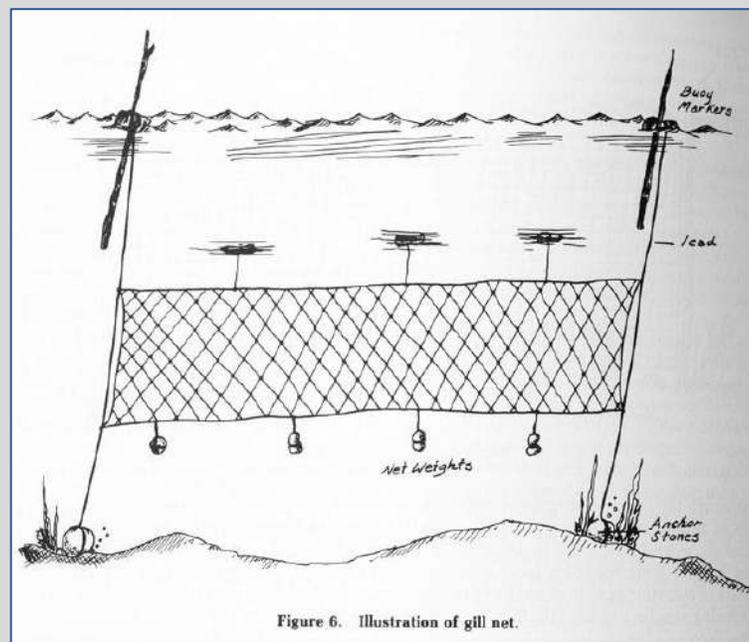
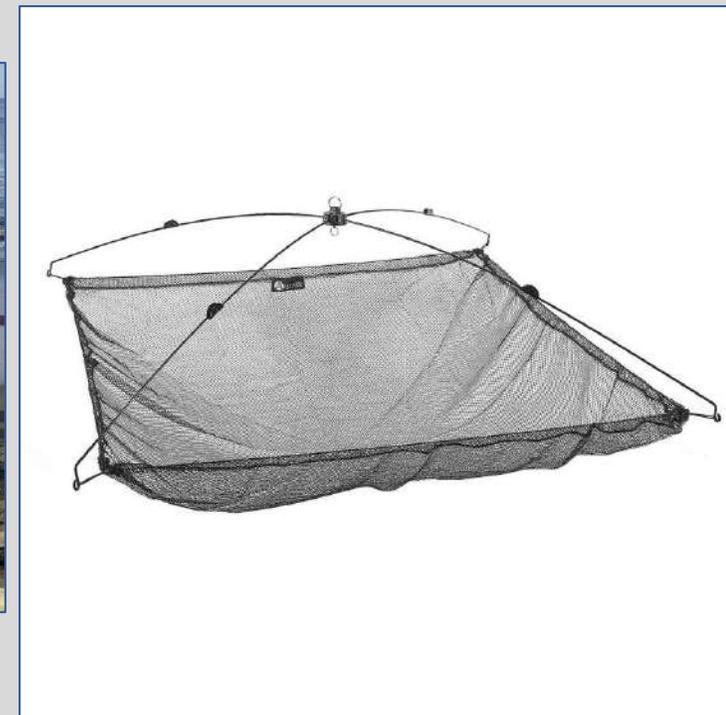


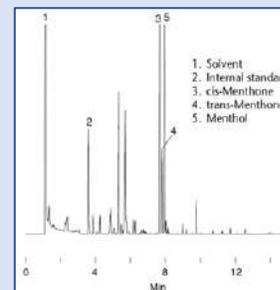
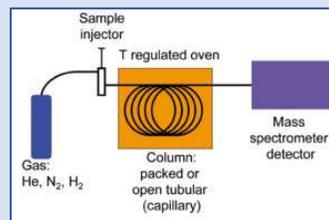
Figure 6. Illustration of gill net.

# Matériel et Méthodes

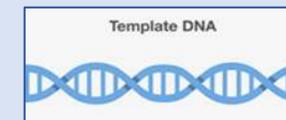
## Echantillonnage



## 2A) Chromatographie en Phase Gazeuze



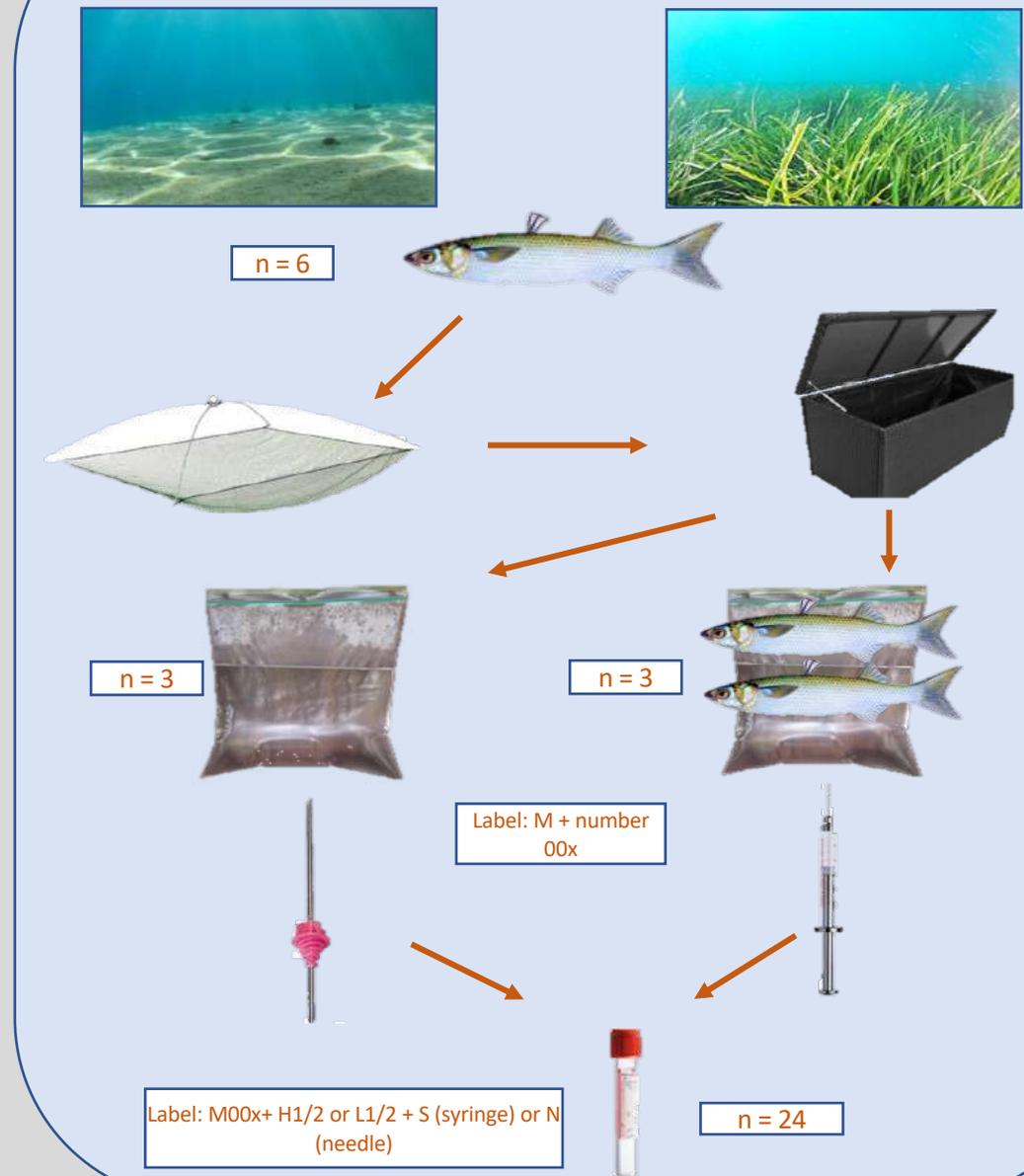
## 2B) Analyse génétique



# Matériel et Méthodes

- Palavas / Thau
- 6 individus adultes / 60 juvéniles
- Test du matériel
- Réduire le stress : 25min de repos
- Incubation 1h en conditions constantes
- Test des méthodes de prélèvement
- Espace de tête et partie aqueuse

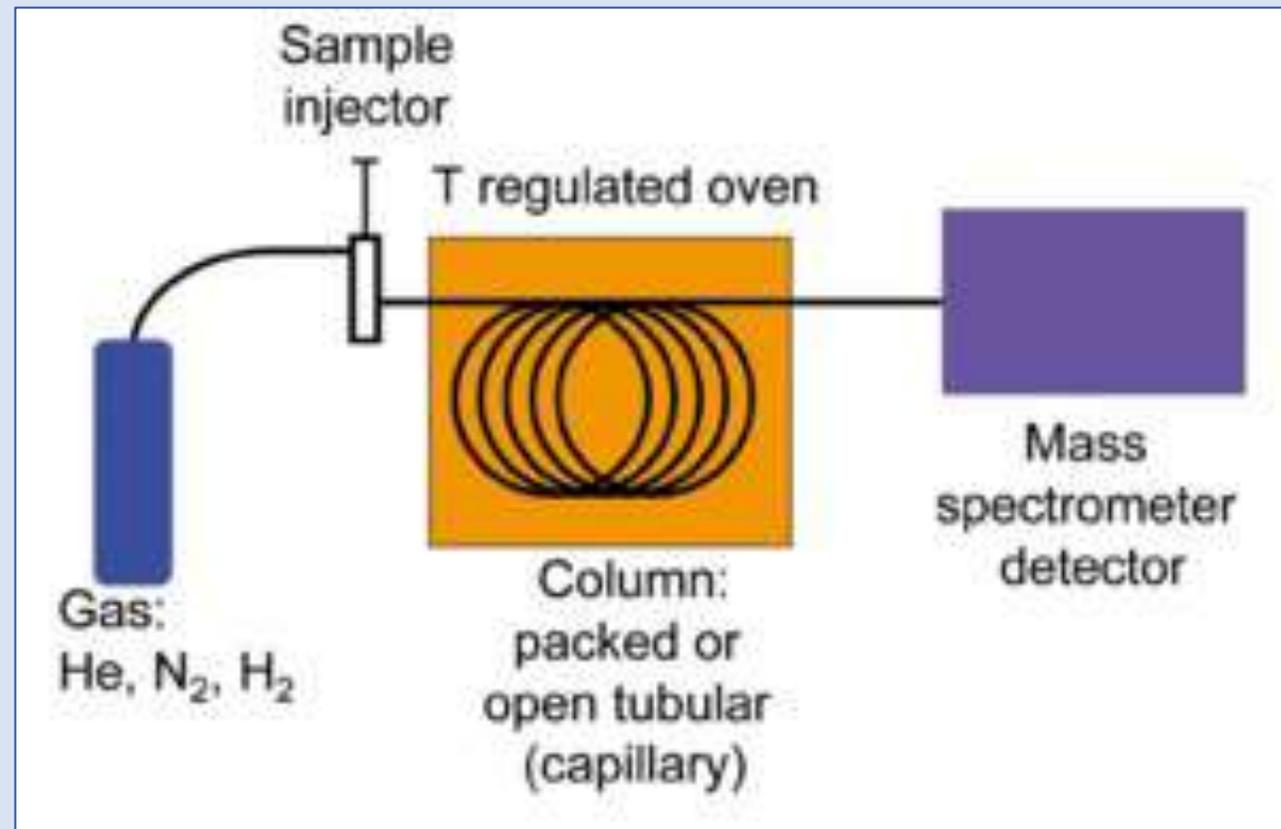
## I) Echantillonnage



# Matériel et Méthodes

- Objectif: détection  $\text{CH}_4$
- Mélange homogène
- Méthane trace
- Injection : manuelle
- Gaz vecteur : He /  $\text{N}_2$
- Colonne : capillaire
- Détection : TCD
- Traitement des résultats

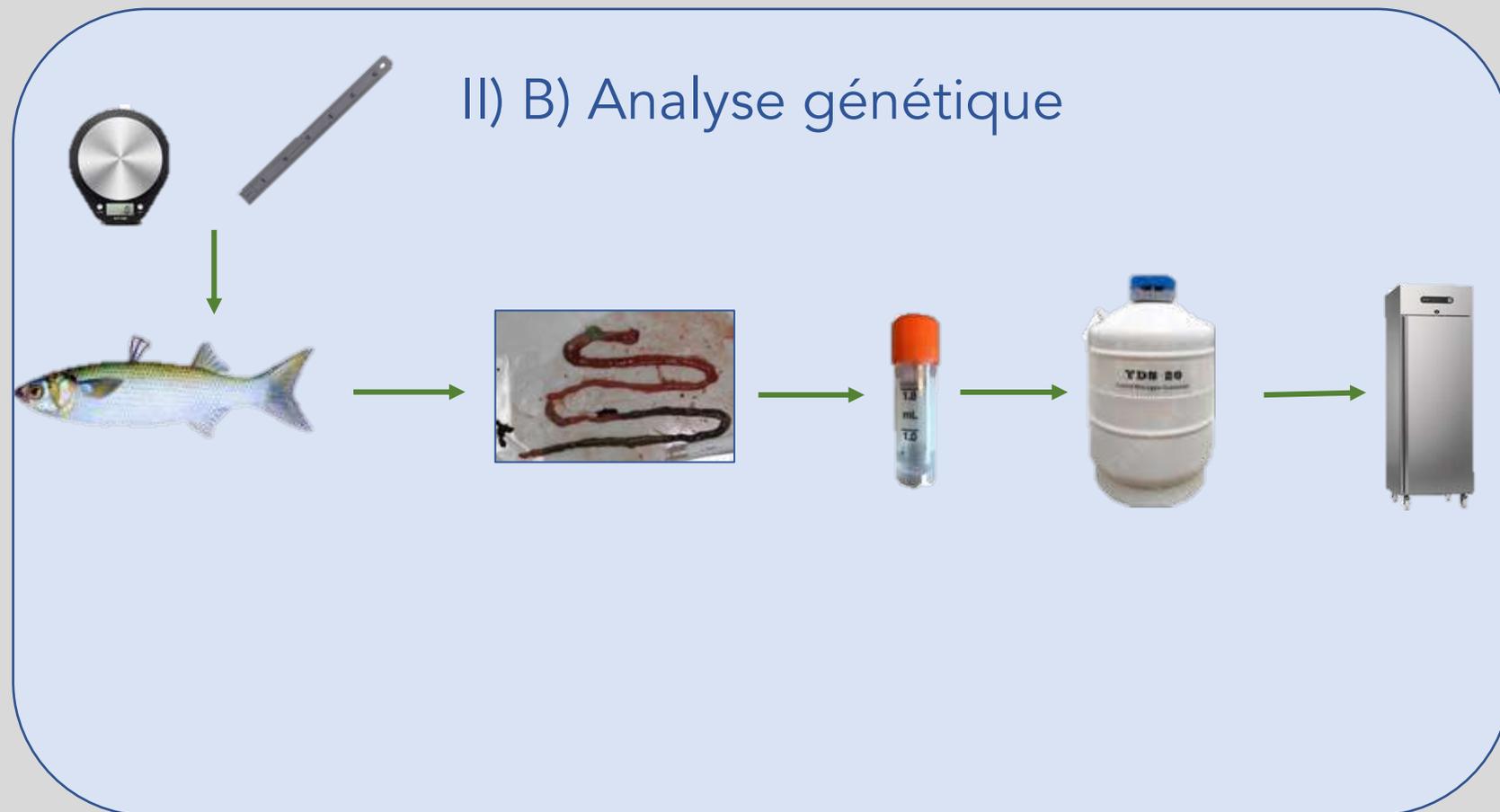
## II) A) Chromatographie en phase gazeuse





# Matériel et Méthodes

- Objectif: caractérisation des communautés d'archaea
- Nécessite d'amplifier
- Caractéristiques poisson
- Extraction tractus intestinal
- Stockage Azote liquide
- Extraction ADN au labo



# Matériel et Méthodes

## 1) PCR amorces gène 16S :

Diversité, optimisation

## 2) PCR amorces gène mcrA:

Diversité méthanogènes

## 3) qPCR amorces gène mcrA:

Abondance méthanogènes

## 4) Séquençage ADN

Diversité taxonomique

## II) B) Analyse génétique

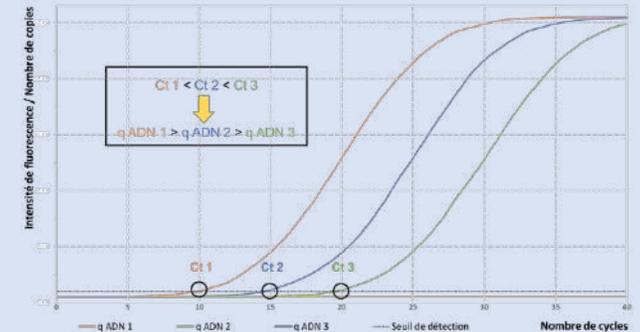
1



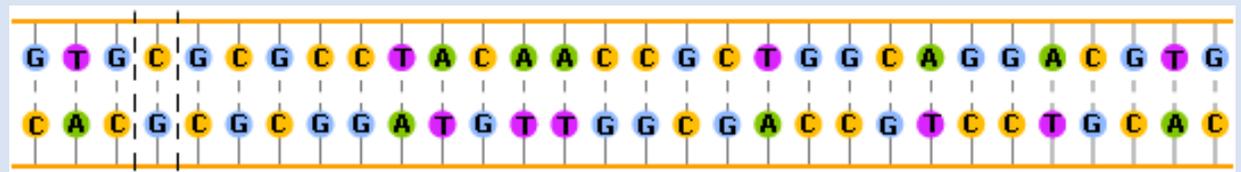
2



3

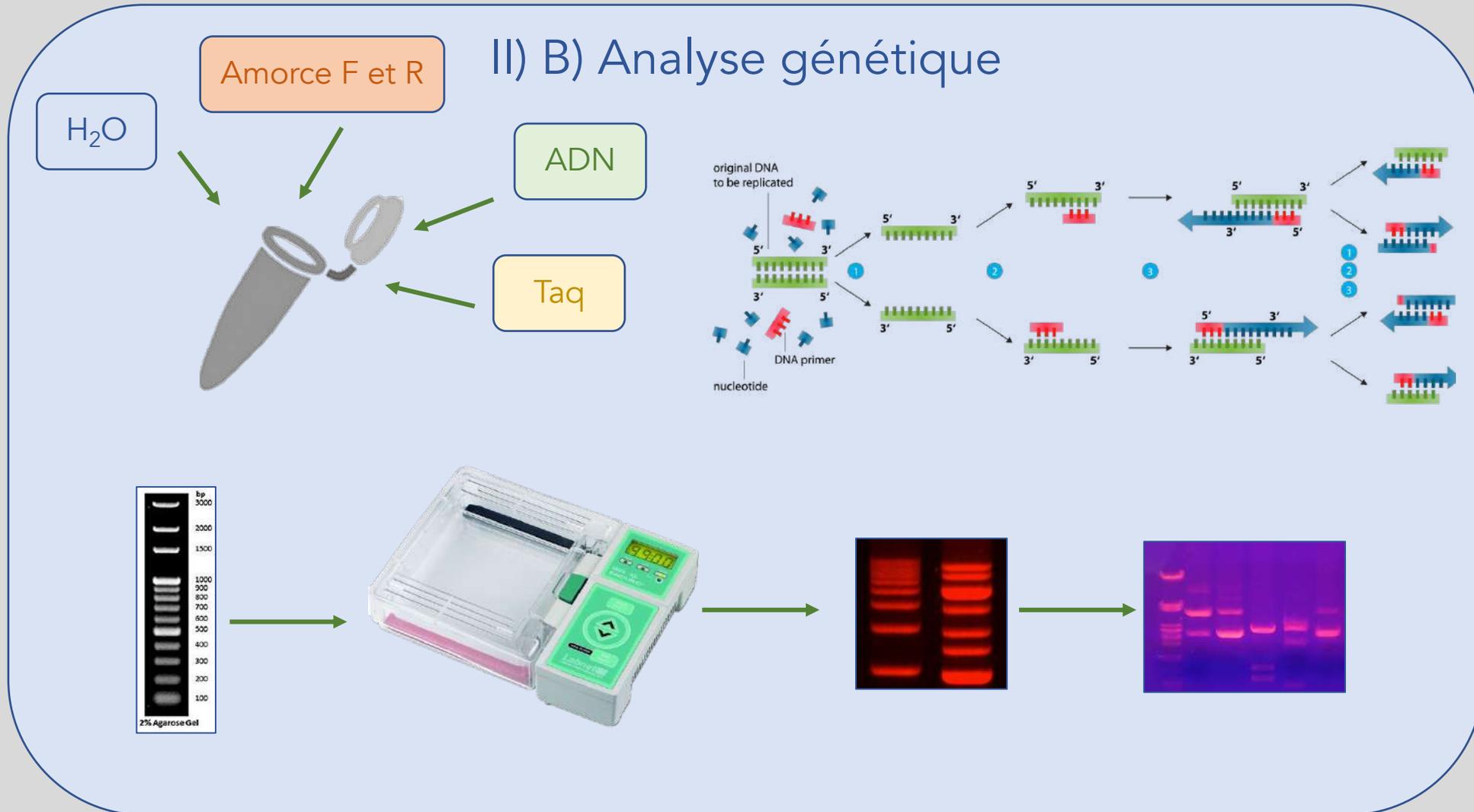


4



# Matériel et Méthodes

- PCR mcrA
- Préparation du mix
- Thermocycleur
- Electrophorèse
- Détection UV





# Résultats

- Site de Palavas
- Conditions météo : 24°C et 15°C





# Résultats

- Site de Palavas
- Conditions météo : 24°C et 15°C
- Pêche au filet maillant :  $n = 57$
- Saupes et sardines juvéniles :  
TL = 5,6 cm, biomasse: 68,2 g





# Résultats

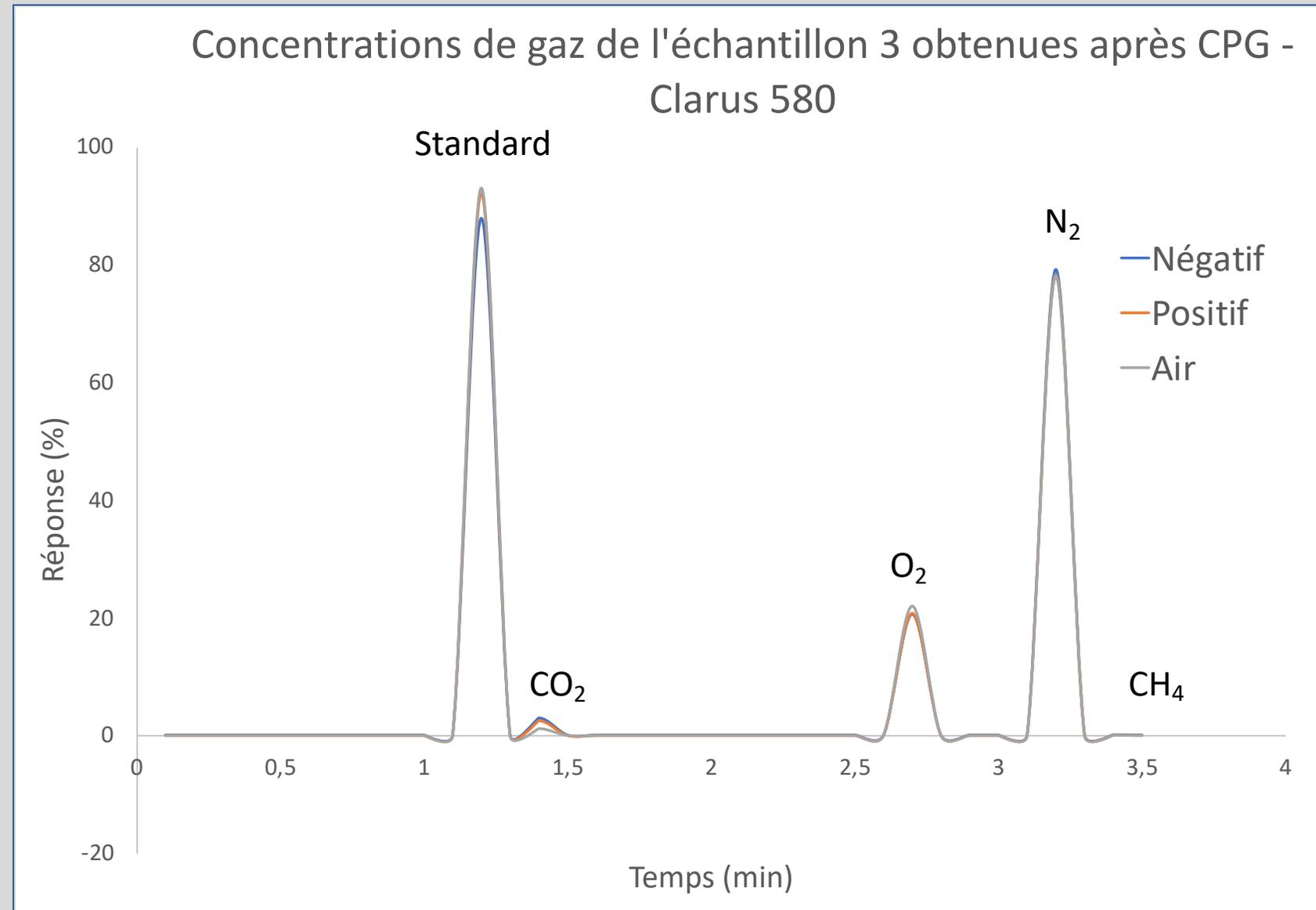
- Site de Palavas
- Conditions météo : 24°C et 15°C
- Pêche au filet maillant : n = 57
- Saupes et sardines juvéniles :  
TL = 5,6 cm, biomasse: 68,2 g
- Système de double aiguille
- 5 mésocosmes
- 10 espaces de tête
- 12 prélèvement aqueux





# Résultats

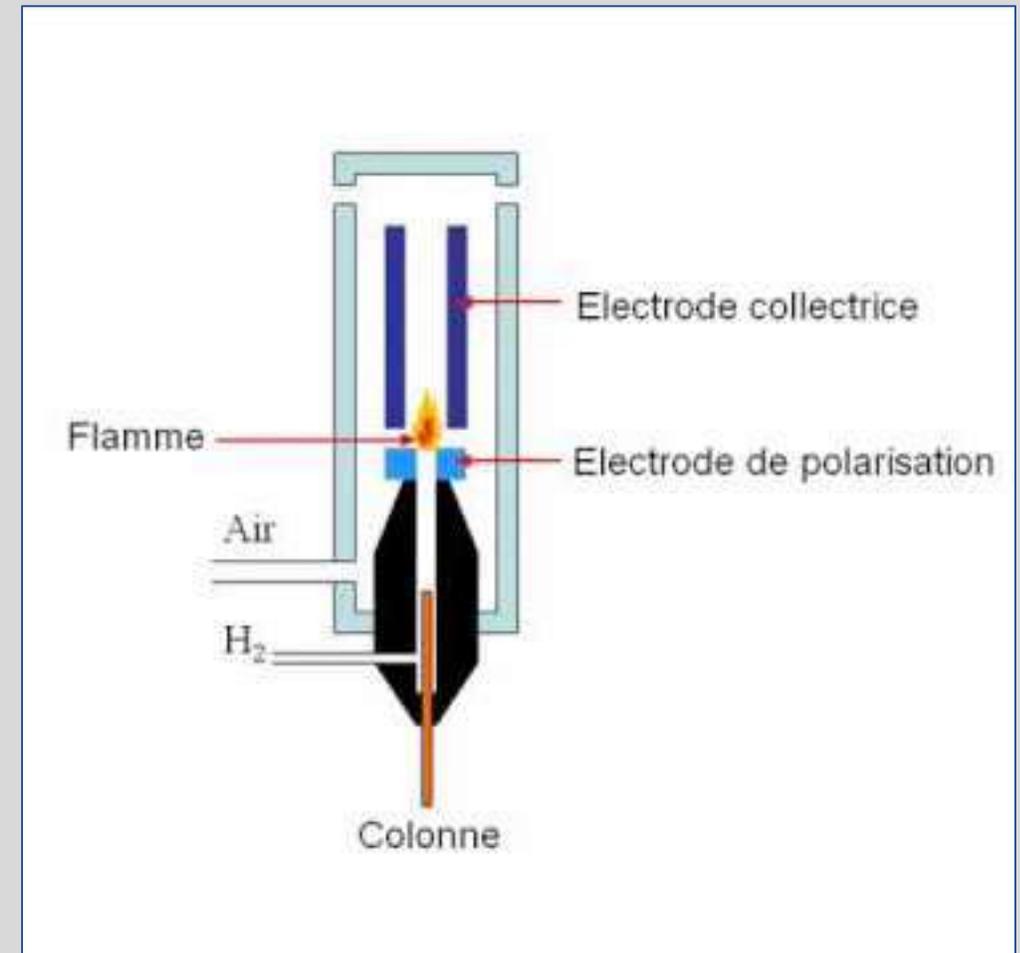
- CPG :
- Test air environnant :  
78,1% N<sub>2</sub> 21,99% O<sub>2</sub>
- Test négatif : baisse O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>
- Test positif : Saupe
- Idem échantillons Israël





# Discussion

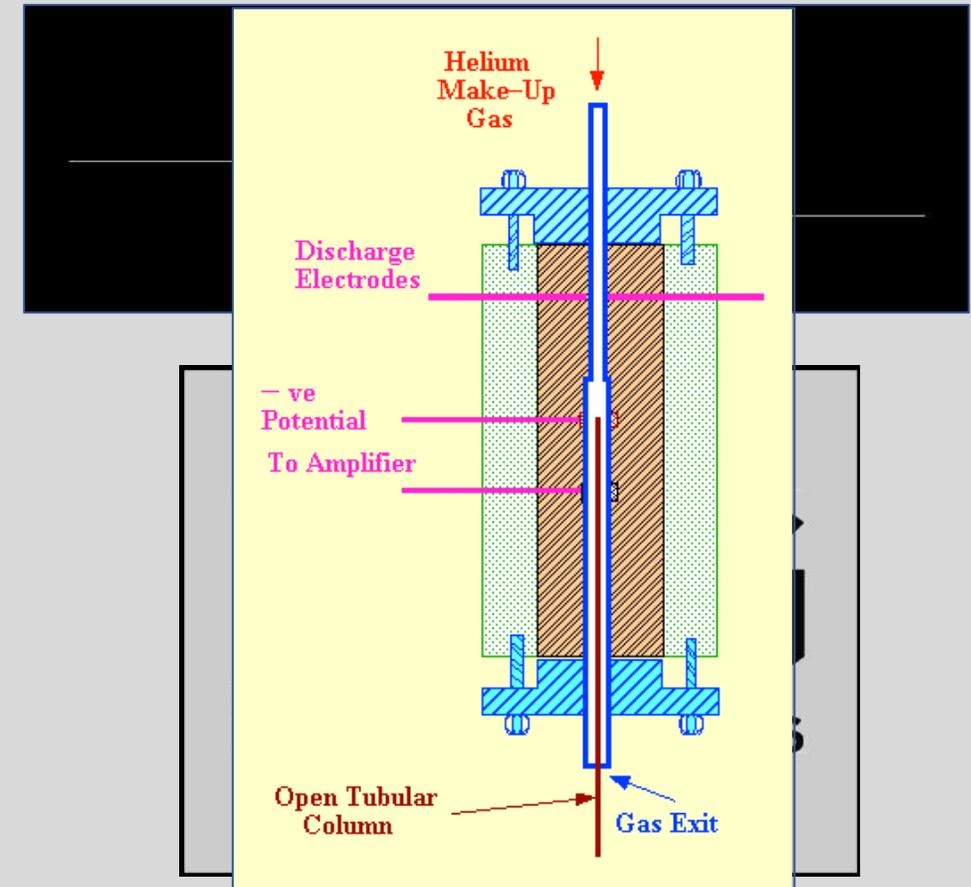
- Test non concluant
- Contamination des flacons
- 24h – comparable à la bibliographie
- Seuil de détection
- Changement de détecteur : FID
- Concentrer nos échantillons?





# Discussion

- Prospection en laboratoire :
- IFREMER Brest : test 10 échantillons
- EAG Toulouse : seuil à 1ppm
- Antelia Lyon : FID + PDID :  
photo-ionisation

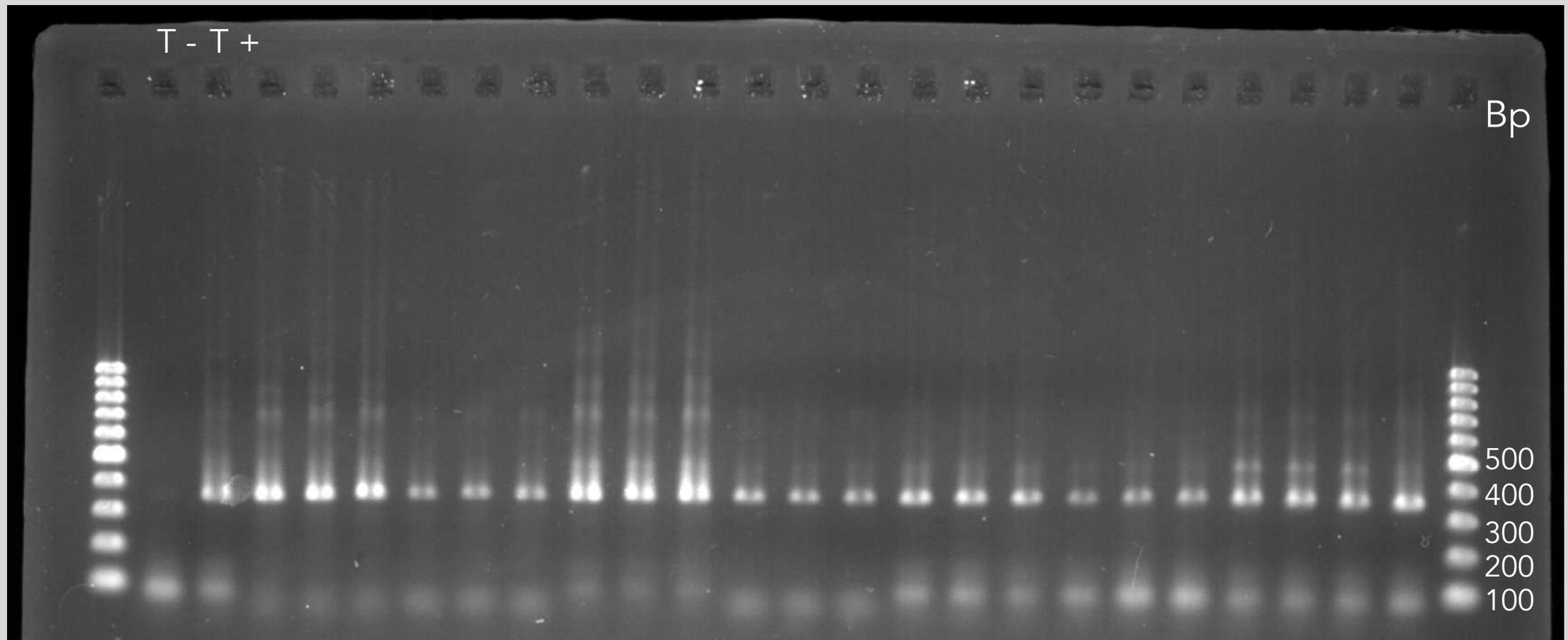


ANTELIA



# Résultats

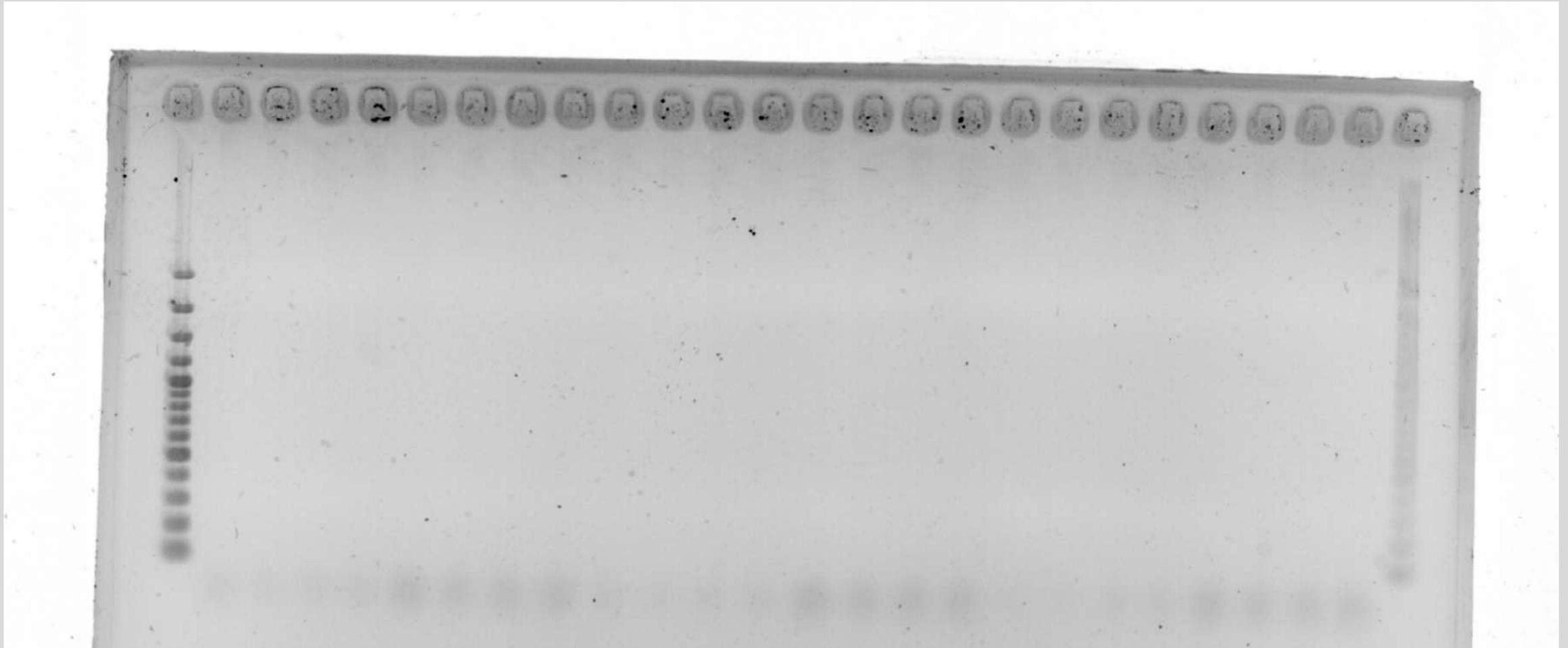
- Extraction ADN puis Spectrophotomètre NanoDrop : n = 52
- PCR gène 16S
- Détection
- Dimères d'amorce





# Résultats

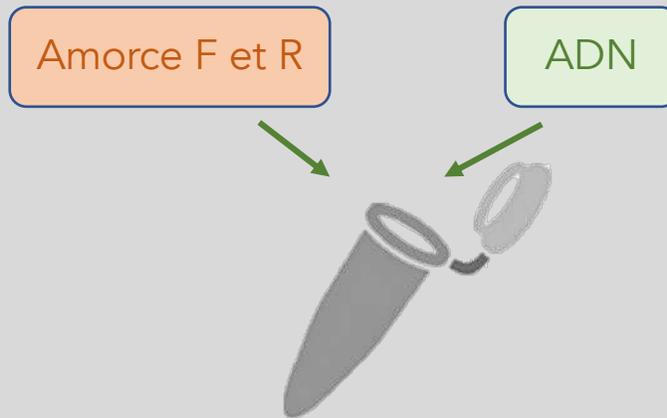
- PCR mcrA : pas de détection



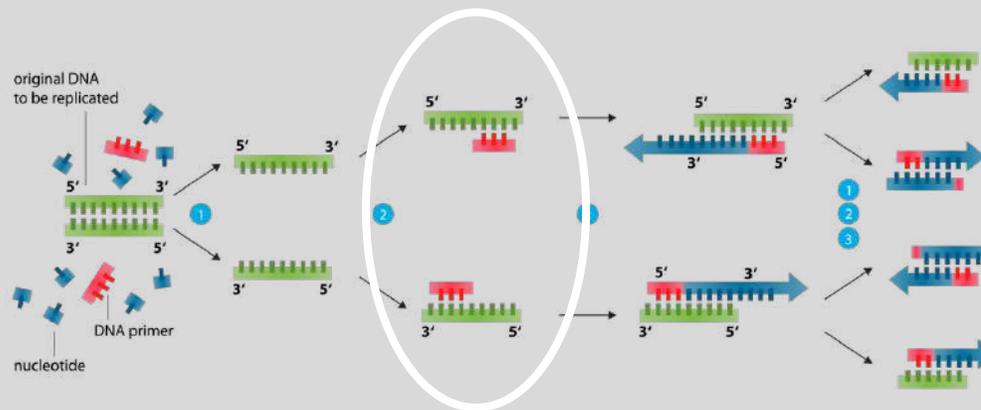


# Résultats

- PCR mcrA : pas de détection
- plan d'expérience



n=12	M1( $\mu$ l)	M2( $\mu$ l)	M3( $\mu$ l)	M4( $\mu$ l)
PF	0,5	1,25	0,5	1,25
PR	0,5	1,25	0,5	1,25
ADN	1	1	2	2

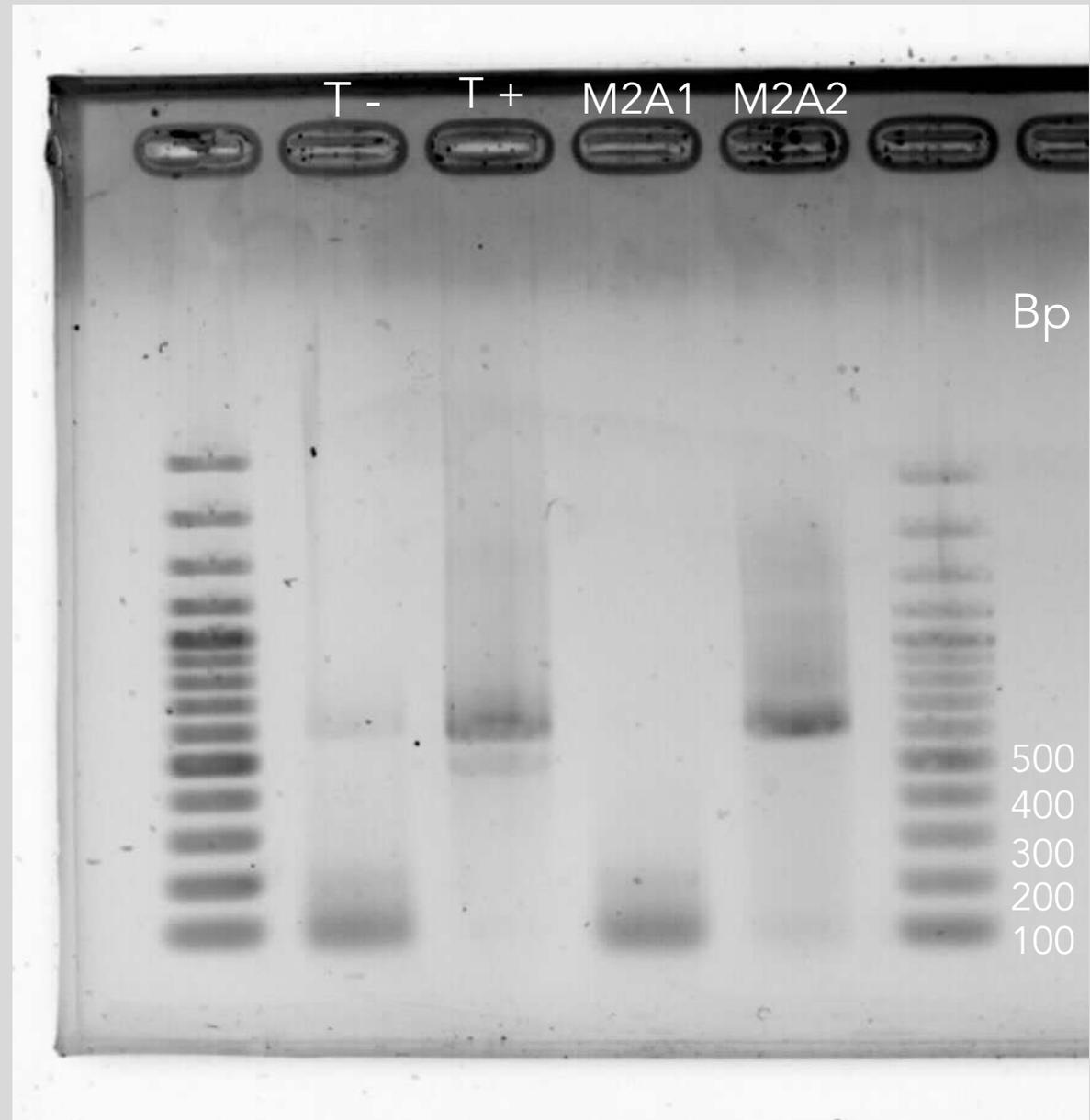


Température d'hybridation : 54 °C - 56°C - 58°C



# Résultats

- Amorces à 1,25  $\mu\text{l}$  - ADN à 1  $\mu\text{l}$
- 1 échantillon qui a réagi
- Autres tests non concluants – y compris les positifs
- Nouveaux tests sur excréments pour isoler les amorces





# Discussion

- Présence d'Archaea validée
- Présence d'Archaea méthanogènes validée : Van der Maarel 1999
- Activité des méthanogènes ?



*Platichthys flesus*



# Discussion

- Présence d'Archaea validée
- Présence d'Archaea méthanogènes validée : Van der Maarel 1999
- Activité des méthanogènes ?
- Stabilisation amorces
- Contamination des échantillons
- Faible quantité d'ADN
- qPCR: besoin d'une gamme d'étalonnage

METH-F : RTRYTMTWYGACCARATMTG

METH-R : YTG DGAWCCWCCRAAGTG

(Colwell et al., 2008) : sédiments Canada

ME3M- F : ATGTCNGGTGHGTMGGSTTYAC

ME2M- R : TCATBGCRTAGTTDGGRTAGT

(Nunoura et al., 2008) : sédiments Japon



# Conclusion

- Méthode de caractérisation de l'activité des archaea méthanogènes chez plusieurs espèces de poissons

## 1) Echantillonnage

- Validé pour juvéniles
- Adultes ? Mulets ?
- Planification

### Echantillonnage



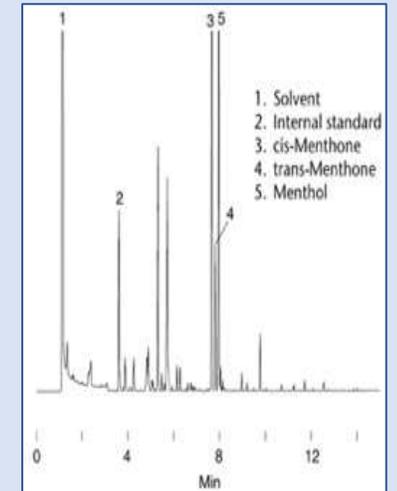
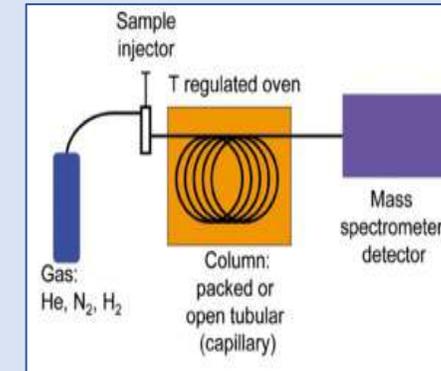


# Conclusion

## 2A) Chromatographie en phase gazeuse :

- Premiers tests non concluants
- Modification de la détection
- Modification du protocole ?

### 2A) Chromatographie en Phase Gazeuze





# Conclusion

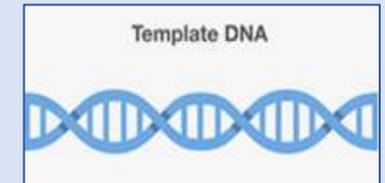
## 2B) Réaction en chaîne par polymérase :

- Méthode adaptée
- Communauté d'Archaea méthanogènes
- Qualification et quantification de leur activité

## • Conclusion :

- Niche écologique
- Niche scientifique
- Variabilité inter-individuelle

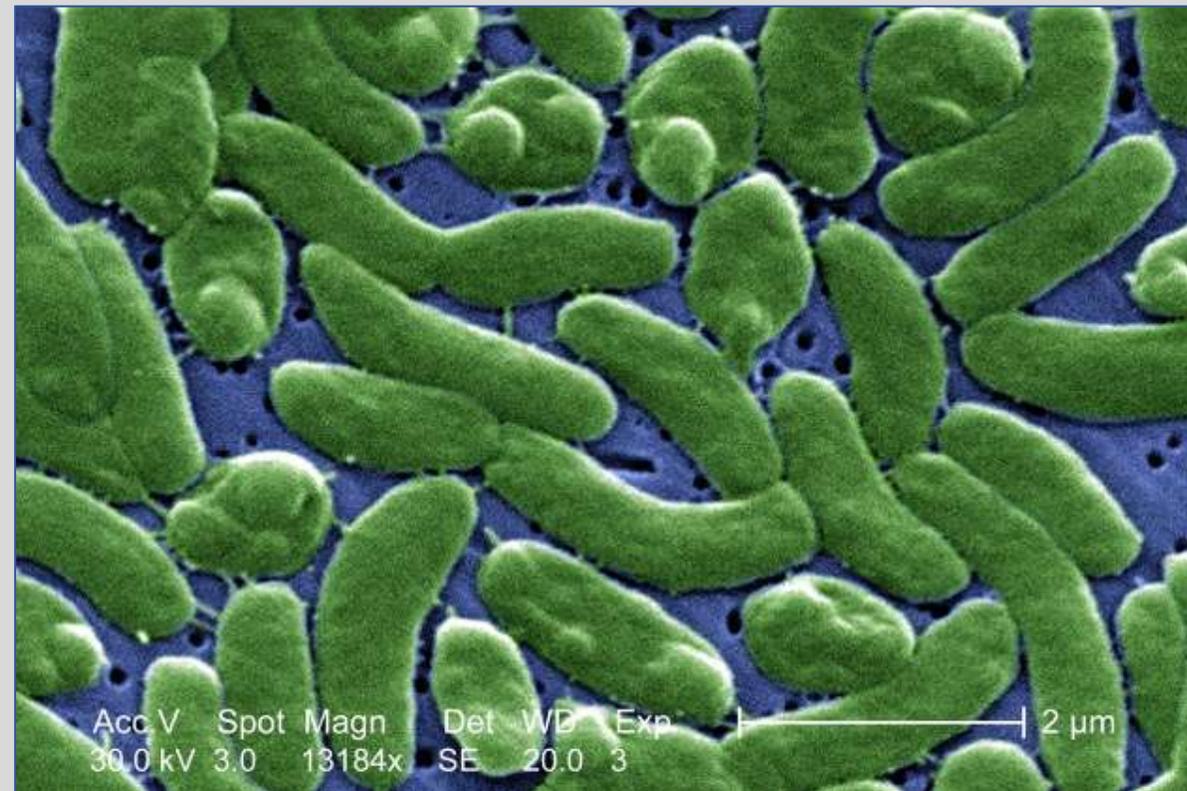
## 2B) Analyse génétique





# Limites

- CPG - de multiples contraintes :
- Biologique : anoxie, stress et libération d'ammonium
- Bactéries nécrophages
- Détection : réduire l'espace de tête? Augmenter le nombre d'individus?
- Transport : échanges gazeux
- PCR : nombre d'Archaea
- Précision PCR pour répliquats
- Première phase avant séquençage ADN et identification



*Vibrio vulnificus*



# Perspectives

- Partenariats : Stockholm
- Autre technologie : BID
- Bilan

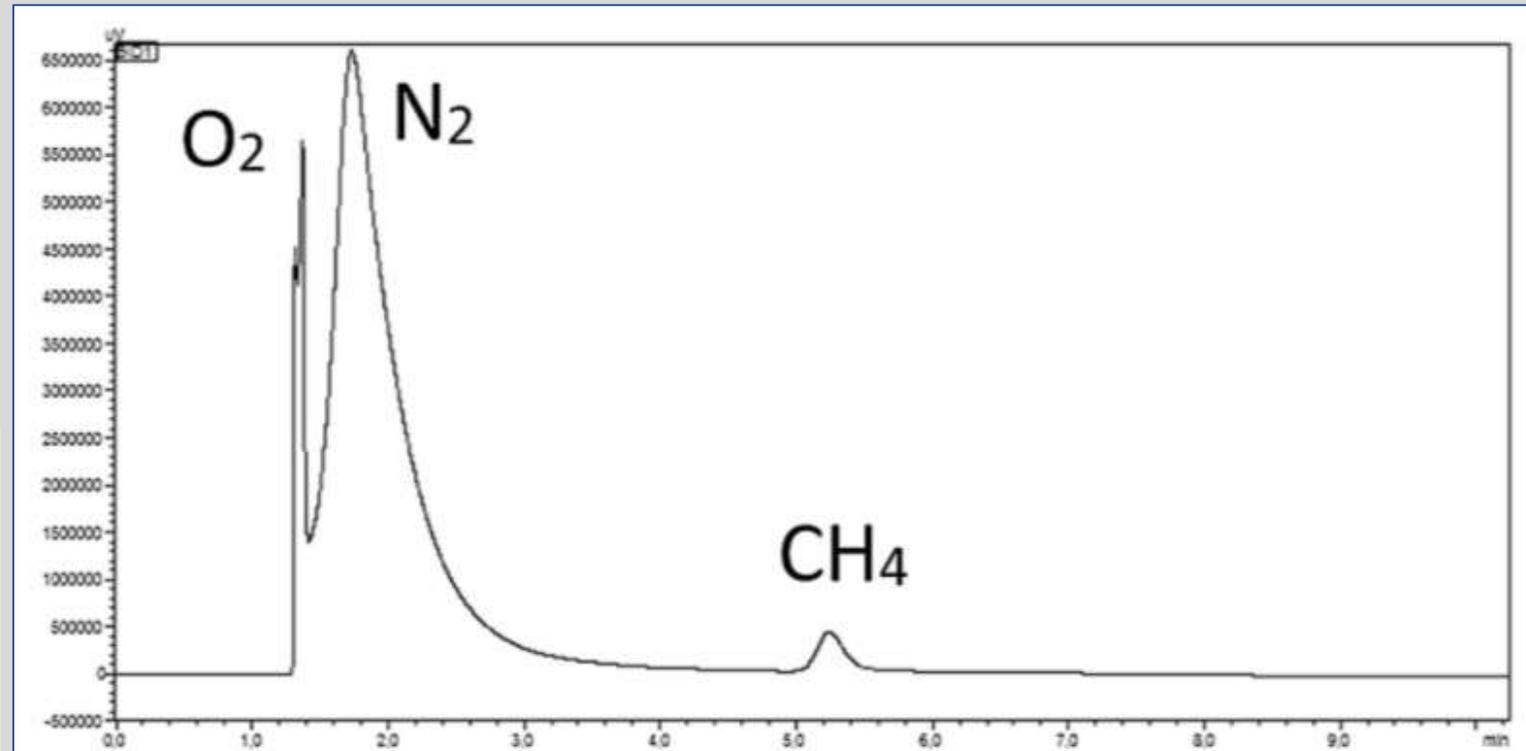
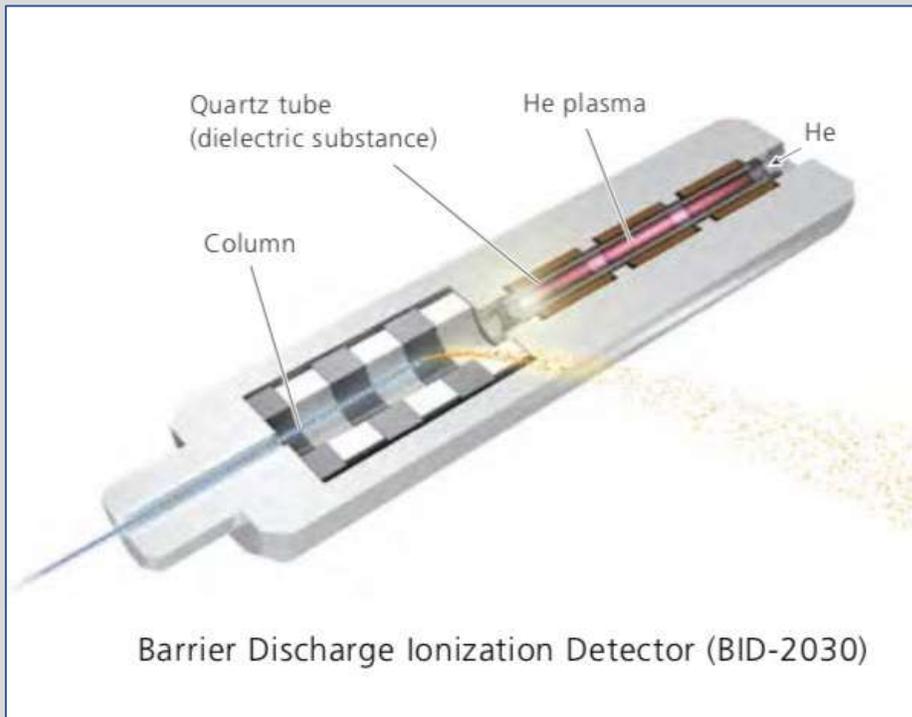
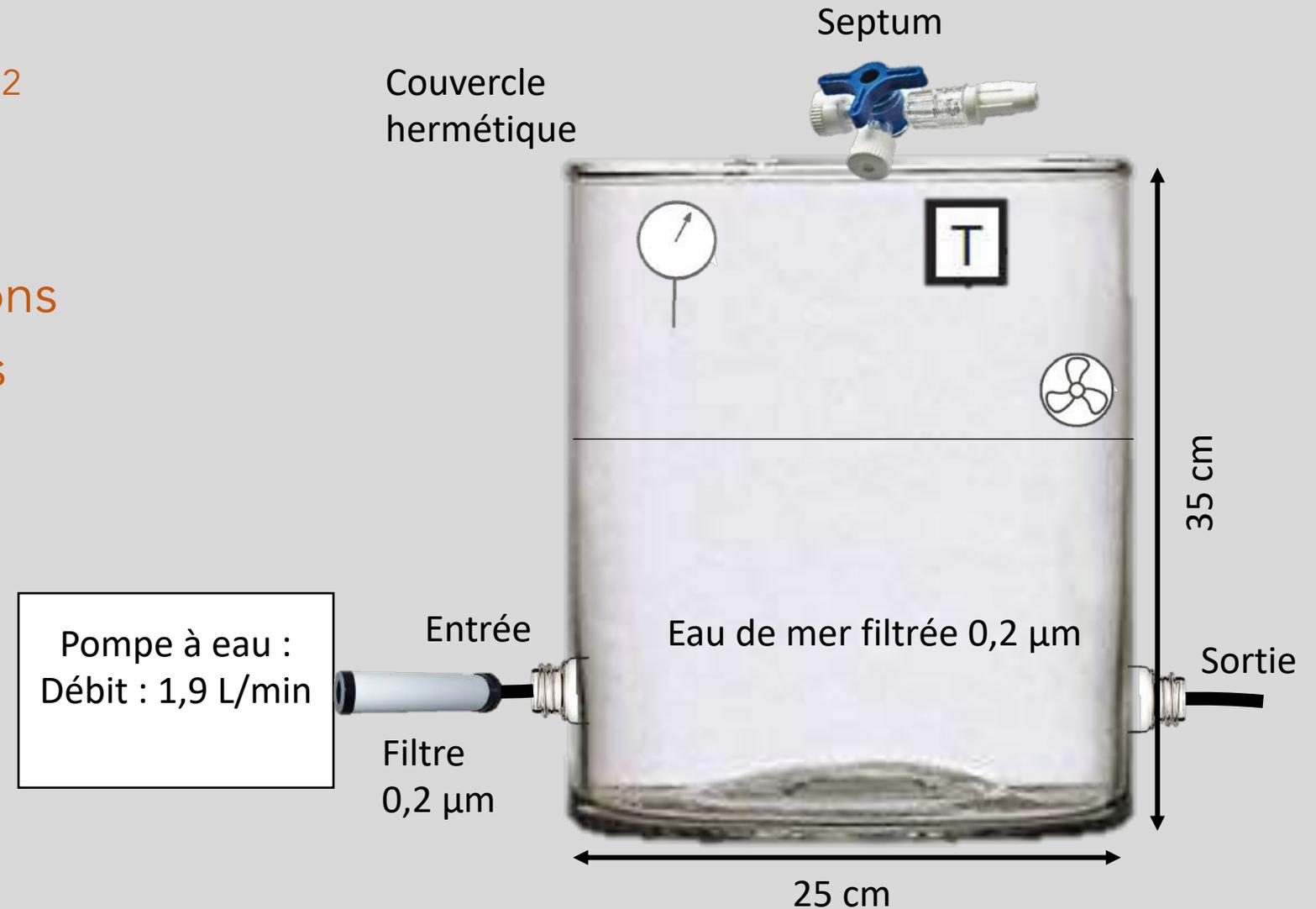


Fig. 2. GC-BID trace of major air components (oxygen, nitrogen and methane) at retention times of 1.4, 2.1 and 5.2 min.



# Perspectives

- Mesure statique : baisse  $O_2$
- Modèle dynamique:
- Maintien des espèces
- Evolution des concentrations
- Conditions expérimentales
- Fonctionnement
- Respirométrie Palavas
- Variations du régime alimentaire, salinité
- Plusieurs espèces ?



# Ouverture

- Le microbiote :
  - Interaction et influence sur l'écosystème
  - Evolution individuelle et collective
- Les flux de méthane :
  - Baltic Blue Growth Project



# Bibliographie

1. Bhattacharyya P, Sinhababu DP, Roy KS, et al (2013) Effect of fish species on methane and nitrous oxide emission in relation to soil C, N pools and enzymatic activities in rainfed shallow lowland rice-fish farming system. *Agric Ecosyst Environ* 176:53–62. doi: 10.1016/j.agee.2013.05.015
2. Bogard MJ, del Giorgio PA, Boutet L, et al (2014) Oxic water column methanogenesis as a major component of aquatic CH<sub>4</sub> fluxes. *Nat Commun* 5:. doi: 10.1038/ncomms6350
3. Bonaglia S, Brüchert V, Callac N, et al (2017) Methane fluxes from coastal sediments are enhanced by macrofauna. *Sci Rep* 7:. doi: 10.1038/s41598-017-13263-w
4. Chen Y, Dong S, Wang F, et al (2016) Carbon dioxide and methane fluxes from feeding and no-feeding mariculture ponds. *Environ Pollut* 212:489–497. doi: 10.1016/j.envpol.2016.02.039
5. Chiarello M, Auguet J-C, Bettarel Y, et al (2018) Skin microbiome of coral reef fish is highly variable and driven by host phylogeny and diet. *Microbiome* 6:. doi: 10.1186/s40168-018-0530-4
6. da Silva MG, Packer AP, Sampaio FG, et al (2018) Impact of intensive fish farming on methane emission in a tropical hydropower reservoir. *Clim Change* 150:195–210. doi: 10.1007/s10584-018-2281-4
7. Davidson TA, Audet J, Svenning J-C, et al (2015) Eutrophication effects on greenhouse gas fluxes from shallow-lake mesocosms override those of climate warming. *Glob Change Biol* 21:4449–4463. doi: 10.1111/gcb.13062
8. Evans PN, Boyd JA, Leu AO, et al (2019) An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nat Rev Microbiol*. doi: 10.1038/s41579-018-0136-7
9. Friberg IM, Taylor JD, Jackson JA (2019) Diet in the Driving Seat: Natural Diet-Immunity-Microbiome Interactions in Wild Fish. *Front Immunol* 10:. doi: 10.3389/fimmu.2019.00243
10. Kirschke S, Bousquet P, Ciais P, et al (2013) Three decades of global methane sources and sinks. *Nat Geosci* 6:813–823. doi: 10.1038/ngeo1955
11. Metral L, Brisset B (2011) Fiches pratiques d'aide au l'identification des especes marines de Mediterranee occidentale. Ifremer V2.2 (version Jan2011)
12. Talwar C, Nagar S, Lal R, Negi RK (2018) Fish Gut Microbiome: Current Approaches and Future Perspectives. *Indian J Microbiol* 58:397–414. doi: 10.1007/s12088-018-0760-y
13. Yang P, Zhang Y, Lai DYF, et al (2018) Fluxes of carbon dioxide and methane across the water–atmosphere interface of aquaculture shrimp ponds in two subtropical estuaries: The effect of temperature, substrate, salinity and nitrate. *Sci Total Environ* 635:1025–1035. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.102
14. Zhu L, Che X, Liu H, et al (2016) Greenhouse gas emissions and comprehensive greenhouse effect potential of *Megalobrama amblycephala* culture pond ecosystems in a 3-month growing season. *Aquac Int* 24:893–902. doi: 10.1007/s10499-015-9959-7

# Crédit photo

1. <https://www.futura-sciences.com/sciences/photos/>
2. <https://www.bsip.com/>
3. [http://www.oneworldocean.com/blog/entry/scientists\\_unravel\\_the\\_ocean\\_methane\\_mystery](http://www.oneworldocean.com/blog/entry/scientists_unravel_the_ocean_methane_mystery)
4. <https://www.nature.com/articles/nrmicro1931>
5. <http://www.biochemsoctrans.org/content/41/1/421>
6. <http://bugs-in-your-guts.com/?p=290>
7. <https://www.pnas.org/content/116/11/5037>
8. <https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0045313.g001>
9. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452231716300148>
10. <https://www.sciencesetavenir.fr/>
11. [www.cnrs.fr/cnrs-images/](http://www.cnrs.fr/cnrs-images/)
12. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/>
13. <https://etienneklein.fr/>
14. <http://doris.ffessm.fr/>

Des  
questions?

