

Axe 4 Bloc 2A : Communautés microbiennes dans les rivières du bassin de la Seine: diversité et lien avec la présence de polluants chimiques

Isabelle George^{1*}, Adriana Anzil¹, Raphaël Lanckman¹, Nathalie Meyer¹, Thierry Berthe²,
Fabienne Petit², Lise Fechner³, P.Servais¹

¹ Ecologie des Systèmes Aquatiques (ESA), Université Libre de Bruxelles, Belgique

² CNRS UMR 6143 M2C - Université Rouen/Caen

³ Irstea Antony, UR HBAN, Antony

* igeorge@ulb.ac.be

Les travaux réalisés en 2012 sur les communautés microbiennes du bassin de la Seine avaient pour objectif :

- d'obtenir un premier aperçu de la diversité microbienne dans l'eau et les sédiments des rivières du bassin (ESA)
- de lier cette diversité avec l'abondance de microorganismes et l'activité des communautés microbiennes (activité hétérotrophe, très générale, et activité nitrifiante, spécifique à certains taxons) (ESA)
- de voir si cette diversité pouvait être corrélée avec certains paramètres physico-chimiques tels que concentration en oxygène, en cations/anions majeurs, en matière en suspension, en carbone et azote (sous leurs différentes formes), et surtout en certains polluants organiques urbains (mesurés par les laboratoires EPOC et EPHE) tels qu'HAP, PCB, ou disrupteurs endocriniens (bisphénol A (BPA), 4-nonylphénol (4-NP)...) (ESA)
- d'apporter des éléments de compréhension sur l'origine de l'acquisition de la tolérance aux contaminants métalliques des biofilms microbiens qui se développent sous pression multi-métallique (M2C, HBAN)

Dans cet objectif, trois campagnes ont été réalisées en septembre 2011, juillet et décembre 2012 sur l'axe Marnay-Bougival-Triel¹, ainsi qu'une campagne sur des petits ruisseaux à priori peu contaminés du bassin de l'Orgeval en octobre 2011. La plus récente de ces campagnes étant en cours de dépouillement, aucun résultat de celle-ci n'est présenté dans ce rapport. Ces campagnes ont été complétées par des expériences en laboratoire de suivi de la dynamique des communautés microbiennes dans des microcosmes d'eau et de sédiments de Triel artificiellement contaminés avec du BPA ou du 4-NP, afin de mettre en évidence l'existence (ou non) de bactéries tolérantes aux polluants étudiés, voire dégradatrices de ceux-ci dans ce site en aval de Paris.

En parallèle, les équipes M2C et HBAN ont recherché la présence des gènes impliqués dans la résistance au cuivre, cadmium, zinc, argent et mercure dans les communautés du périphyton de deux autres sites (St Cyr-sous-Dourdan et St Maurice).

1. Aspects méthodologiques : choix de la technique de séquençage et optimisation des protocoles d'extraction

La diversité des échantillons a été analysée par pyroséquençage (454 Life Sciences, Roche), qui permet de générer des milliers de signatures phylogénétiques par échantillon (2). Nous avons choisi 3000 (campagnes 2011) et 10000 séquences (campagne 2012) par échantillon. Les résultats ont été traités à l'aide du logiciel MOTHUR (<http://www.mothur.org/>) pour les campagnes 2011. Pour la campagne 2012, nous avons utilisé (par manque de temps) les données de diversité fournies par la firme de pyroséquençage Research and

¹ Marnay se situe sur la Seine à environ 200 km en amont de Paris, alors que Bougival et Triel sont sur la Seine en aval de Paris. De plus, le site de Triel est à l'aval du rejet de la station Seine-Aval. (voir rapport PIREN axe 4 - 2011)

Testing Laboratories, qui possède son propre « pipeline » d'analyse bioinformatique. Bien que celui-ci soit proche de MOTHUR, un léger biais des données générées est possible.

Comme le pyroséquençage révèle non seulement les taxons dominants mais aussi de nombreux taxons rares (qu'on ne voit pas avec la plupart des techniques « classiques » d'analyse de diversité comme la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)), nous avons voulu tester l'utilité de faire des triplicats d'échantillons. Le protocole classique d'extraction d'ADN au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (PCI) a été répété plusieurs fois (avec certaines variantes) sur deux mêmes échantillons d'eau et de sédiments (Figure 1). Les échantillons d'eau ont été filtrés sur des membranes de porosité 0.2 µm jusqu'à colmatage du filtre, et l'ADN a été extrait de ces filtres. Dans le cas des sédiments, l'ADN a été directement extrait d'environ 1g de sédiment.

Nous n'avons pas vu de différence significative dans la diversité phylogénétique au niveau des phyla (Figure 1) ni des genres (données non présentées). Par conséquent, les analyses de pyroséquençage n'ont pas été répliquées sur un même échantillon.

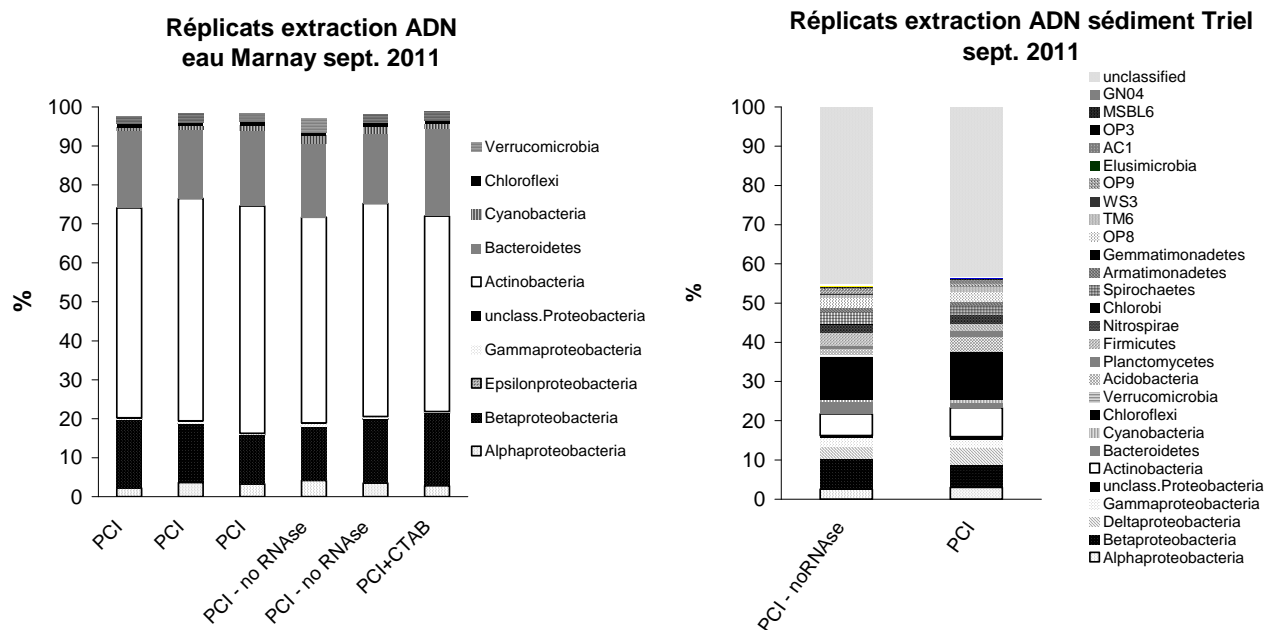


Figure 1 : Abondance relative des différents phyla dans l'eau et les sédiments du site de Marnay. L'extraction d'ADN à l'aide du protocole PCI a été répliquée, parfois avec certaines variantes: pas de traitement de l'ADN extrait à la RNase (dont le but était d'enlever d'éventuelles traces d'ARN) (« no RNase »), ou ajout de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (« +CTAB ») (comme dans les protocoles d'extraction d'ADN d'archées).

Nous avons également comparé l'extraction d'ADN suivant le protocole PCI ou en utilisant des kits d'extraction (MoBio Laboratories : Power Water DNA Isolation kit pour les échantillons d'eau, et Ultra Pure Soil DNA Isolation kit pour les échantillons de sédiments). Nous avons observé les mêmes phyla dominants, mais des différences d'abondances relatives en fonction du protocole d'extraction (Figure 2) répercutées jusqu'aux genres. En particulier, les *Actinobacteria* et *Verrucomicrobia* étaient surreprésentés au détriment des *Cyanobacteria* et *Firmicutes* dans l'ADN extrait à l'aide de kits. Dans les sédiments, une plus grande diversité de phyla a été obtenue avec le protocole d'extraction d'ADN PCI (données non présentées). En conclusion, même si les kits sont plus faciles d'utilisation, ils semblent extraire une moins grande diversité microbienne que les protocoles « maison ».

Ces résultats ont été confirmés par le laboratoire M2C sur des échantillons de biofilm se développant sur des languettes en plastique immergées dans l'eau (protocole expérimental : voir rapport de Lise Fechner (HBAN) des années précédentes). Une partie du travail d'un étudiant en Master 2 (Piriyanthini Peter Rajanayagm) a consisté à comparer différentes techniques d'extraction des communautés microbiennes de

périphyton : kit Mobio Powersoil DNA Isolation, extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique ainsi que la méthode de (3) modifié par (1). Sur la base des rendements obtenus et de la pureté des acides nucléiques, l'extraction à l'aide de phénol-chloroforme semblait être la mieux adaptée pour l'extraction des acides nucléiques des communautés microbiennes du périphyton.

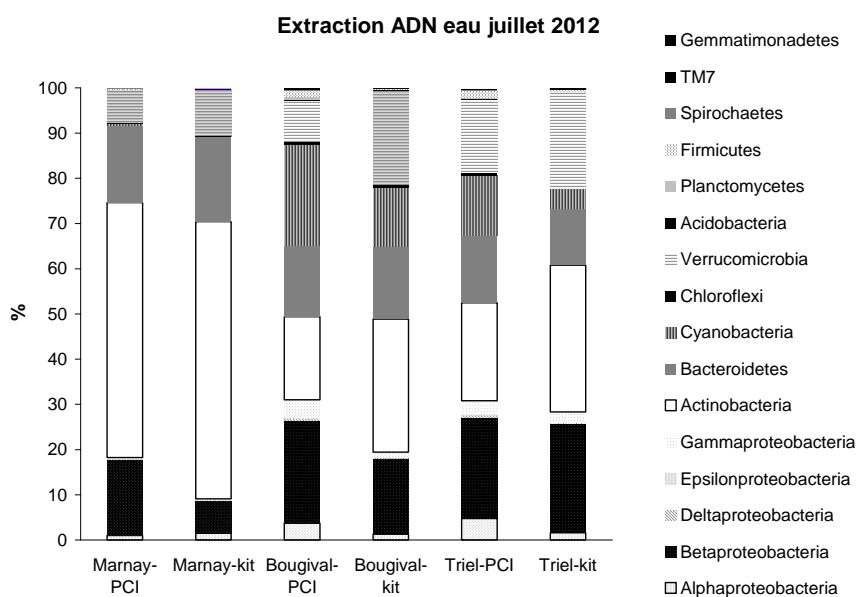


Figure 2 : Abondance relative des différents phyla dans l'eau de Marnay, Bougival et Triel après extraction de l'ADN avec le protocole PCI ou avec un kit MoBio.

2. Premiers résultats sur la diversité des microorganismes dans les rivières du bassin de la Seine

La diversité bactérienne d'échantillons d'eau des trois stations Marnay-Bougival-Triel a été analysée à deux saisons différentes (automne 2011 versus été 2012). Nous avons comparé la microflore « totale » (retenue sur des membranes de porosité 0.2 μm) avec celle attachée aux particules dans la colonne d'eau (retenue sur des membranes de porosité 5 μm). Enfin, la communauté microbienne de la colonne d'eau de 5 petits ruisseaux du bassin de l'Orgeval a également été étudiée (Figure 3).

De manière générale, nous avons constaté une grande diversité de phyla et genres dans la colonne d'eau des tous les sites échantillonnés (Figure 3 et 7), avec une dominance

- d'*Actinobacteria* (dont un genre très abondant non identifié),
- de β -*Proteobacteria* (dont des taxons typiques des eaux douces, comme des *Comamonadaceae* (genre non identifié) ou *Polynucleobacter*),
- de *Bacteroidetes* (surtout le genre *Flavobacterium*),
- d' α -*Proteobacteria* (dont le genre dominant *Limnohabitans*, inféodé aux eaux douces)
- de *Cyanobacteria* (microorganismes photosynthétiques)
- de *Verrucomicrobia* (d'habitude associés aux sols).

Il y avait peu de différence de structure² entre les communautés « totales » de la colonne d'eau et celles adsorbées sur les particules (« 5 μm ») (Figures 3 et 7). Comme attendu, l'abondance relative des cyanobactéries (phototrophes) était plus importante en été qu'en automne (Figure 3 – données Bougival et Triel). Les communautés bactériennes de la colonne d'eau des petits ruisseaux étaient globalement plus diversifiées que celles des stations de l'axe fluvial, avec une abondance relative plus importante de

² structure= diversité en taxons et abondance relative de ceux-ci.
Communautés bactériennes et polluants chimiques

Bacteroidetes (en particulier le genre *Flavobacterium*, souvent impliqué dans la dégradation de la matière organique d'origine végétale) et γ -*Proteobacteria* (en particulier le genre *Pseudomonas*, d'origine tellurique) (Figures 3 et 7). Ces résultats suggèrent que l'échantillonnage de la colonne d'eau à ces stations n'était pas optimal et que du sédiment (dont la microflore est toujours plus diversifiée que celle de la colonne d'eau – voir plus loin) pourrait avoir été collecté avec l'eau.

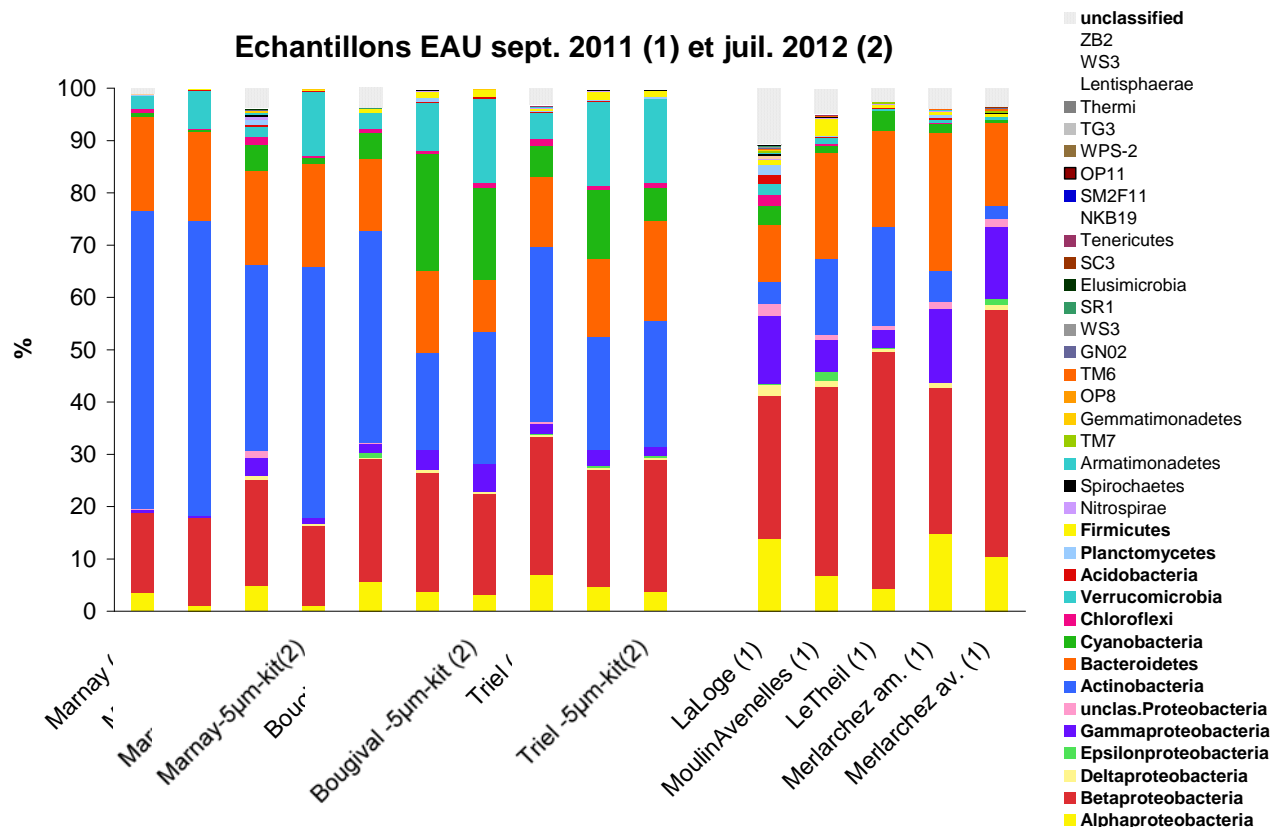


Figure 3 : Abondance relative des différents phyla dans l'eau de Marnay, Bougival, Triel et des 5 ruisseaux du bassin de l'Orgeval lors des campagnes d'échantillonnage de septembre - octobre 2011 (1) et Juillet 2012 (2).

Les sédiments collectés à Marnay, Bougival et Triel présentaient une microflore très différente de celle de la colonne d'eau (Figure 4): la richesse en phyla (nombre de phyla) y était systématiquement supérieure à celle de la colonne d'eau, et certains phyla dominaient les sédiments : β -*Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria* (bactéries sulfato-réductrices, indicatrices de milieux anaérobies), γ -*proteobacteria* et *Acidobacteria* (qui renferment de très nombreux genres inféodés aux sols), *Firmicutes* (bactéries gram + sporulantes), *Planctomycetes* (typique des sédiments) et enfin *Chloroflexi* (un phylum mal caractérisé dont certains membres respirent les polluants organochlorés (TCE, PCB etc.) en anaérobiose). Par ailleurs, de nombreuses séquences issues des sédiments n'ont pas pu être classifiées au niveau du phylum, c'est-à-dire à un niveau de classification phylogénétique peu détaillé. La diversité réelle est donc certainement sous-estimée sur base de l'analyse des phyla connus.

Enfin, nous avons constaté sur la communauté microbienne du biofilm se développant sur des bandelettes plastiques immergées dans l'eau pendant plusieurs semaines au site de Marnay (protocole expérimental : voir rapport de Lise Fechner (HBAN) des années précédentes) ressemblait beaucoup plus à celle du sédiment qu'à celle de la colonne d'eau (Figure 5). Cette analyse complète les études du laboratoire HBAN sur la communauté de microalgues se développant dans ces mêmes biofilms.

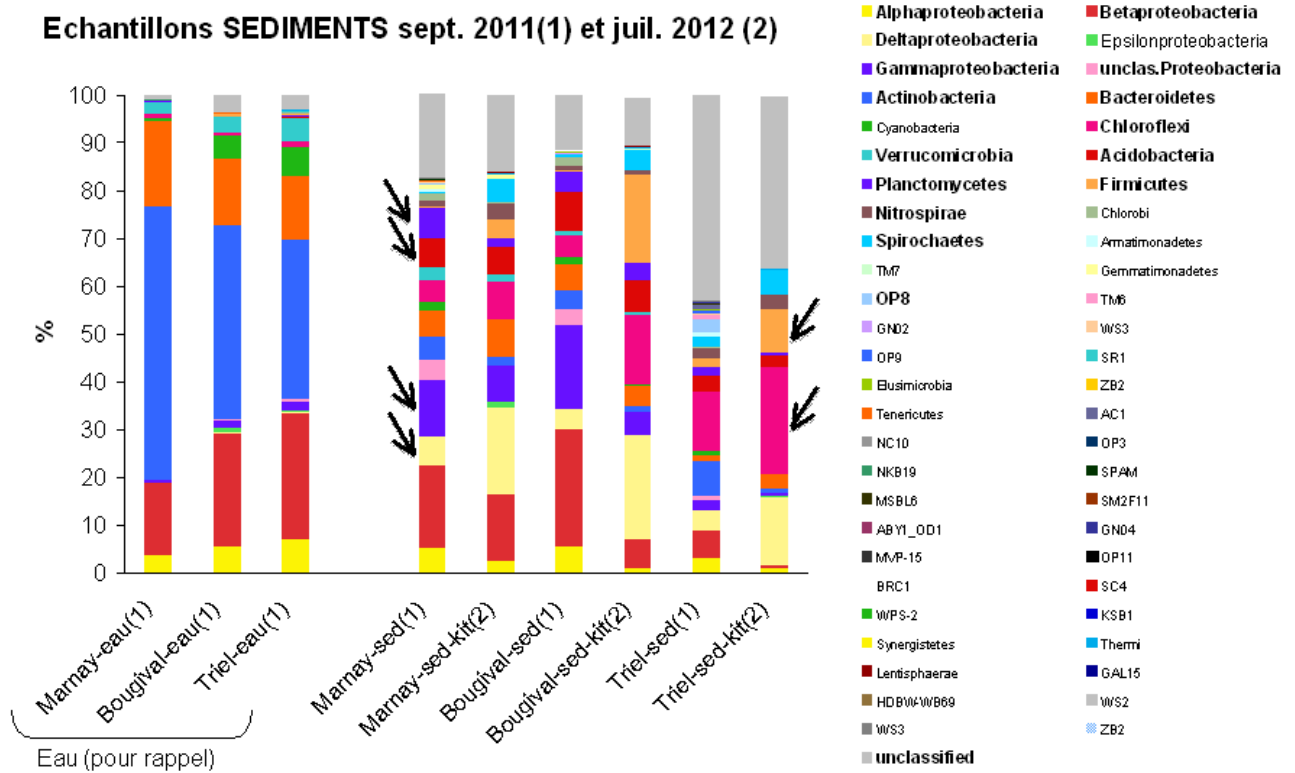


Figure 4 : Abondance relative des différents phyla dans les sédiments de Marnay, Bougival, Triel (en comparaison des échantillons d'eau) lors des campagnes de septembre - octobre 2011 (1) et Juillet 2012 (2). Les phyla dominants dans les sédiments mais pas dans la colonne d'eau sont marqués d'une flèche.

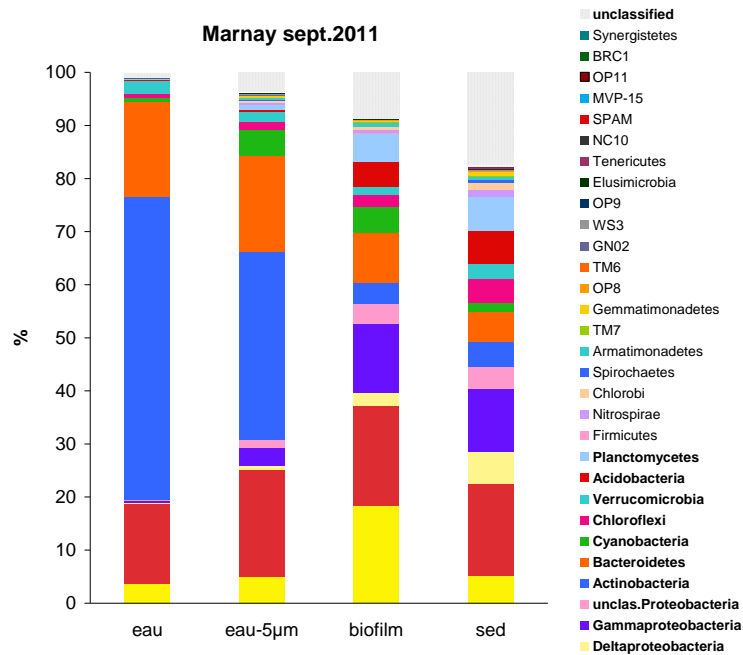


Figure 5 : Comparaison de l'abondance relative des différents phyla dans l'eau, la fraction de bactéries attachées aux particules dans la colonne d'eau, le biofilm et le sédiment du site Marnay en septembre 2011.

3. Lien entre diversité microbienne, abondance microbienne, activité microbienne et paramètres physico-chimiques du milieu.

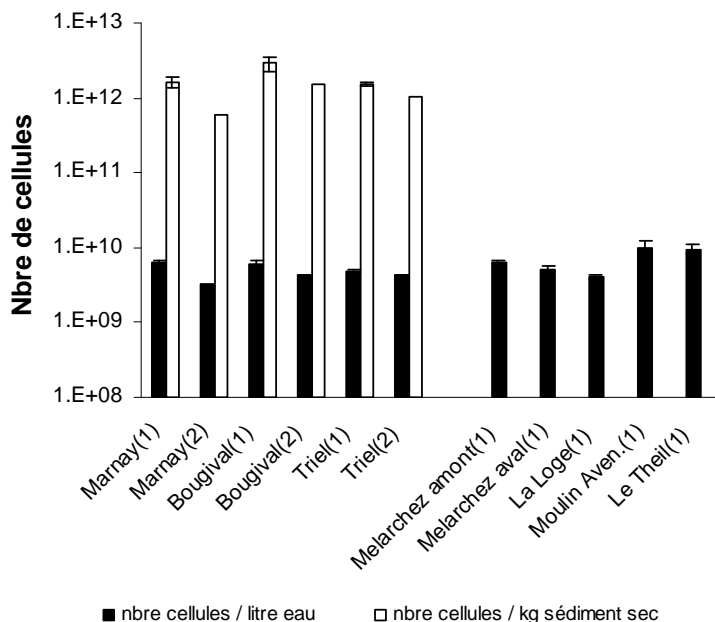


Figure 6 : Abondances de microorganismes dans l'eau et les sédiments des sites Marnay-Bougival-Triel et dans l'eau des petits ruisseaux du bassin de l'Orgeval en septembre-octobre 2011 (1) et juillet 2012 (2).

Nous avons mesuré des abondances microbiennes 100 à 1000 fois supérieures dans les sédiments que dans la colonne d'eau des différents sites échantillonnés (Figure 6). Ces abondances plus élevées allaient de pair avec une diversité en taxons plus élevée (voir paragraphe 2). Les deux paramètres sont donc globalement corrélés mais nous devons affiner nos analyses de diversité pour nous en assurer (notamment par le calcul d'indices de diversité). Par contre, nous n'avons pas observé de corrélation entre la diversité microbienne et l'activité hétérotrophe³ ou nitrifiante potentielle⁴ aux différents sites plus-ou-moins contaminés par des polluants urbains (données non présentées). Notons cependant que les activités nitrifiantes mesurées étaient proches du seuil de détection de la méthode. A ce stade, il ne semble pas que ces activités microbiennes (l'une générale, l'autre spécifique à certains taxons) changent en fonction de la structure des communautés bactériennes.

En ce qui concerne la corrélation entre la diversité microbienne et les paramètres physico-chimiques des échantillons, nous n'avons pas encore récolté suffisamment de données sur ces derniers auprès des autres partenaires de l'axe 4 pour pouvoir réaliser des analyses de type « non parametric Multi-Dimensional Scaling (MDS) ». Cependant, nous avons criblé les genres bactériens dominants détectés dans nos échantillons à la recherche de taxons connus pour dégrader des polluants organiques comme les hydrocarbures linéaires ou (poly)cycliques, le BPA ou le 4-NP (Figure 7). Nous avons détecté de nombreux genres dégradateurs de polluants dans nos échantillons d'eau et surtout de sédiments. Par conséquent, nous avons voulu vérifier la présence de ces bactéries dans des expériences « batch » en laboratoire dans lesquelles de l'eau et des sédiments ont été incubés en présence de polluants (voir paragraphe 4).

³ mesurée par incorporation de ³H-thymidine

⁴ mesurée comme l'incorporation de H¹⁴CO₃⁻ en présence d'une concentration saturante en NH₄⁺ et en l'absence/présence d'inhibiteurs de nitrification

En parallèle de cette étude phylogénétique, une recherche de gènes fonctionnels de résistance à d'autres contaminants urbains (métaux lourds) a été entreprise par le laboratoire M2C. Plus précisément, la présence de gènes impliqués dans la résistance bactérienne au cuivre (*copA*, codant une pompe à efflux de type P_{1B}-ATPase), cadmium, zinc et cobalt (*czcA*, codant une pompe à efflux de type Heavy Metal Efflux-RND) et au mercure (*merA*, codant une réductase mercurique) a été recherchée par PCR à partir des acides nucléiques extraits de biofilms microbiens (périphyton). Les résultats obtenus au niveau des deux sites (St Cyr-sous-Dourdan et St Maurice) ont montré la présence des gènes impliqués dans la résistance au cuivre, cadmium, zinc, argent et mercure.

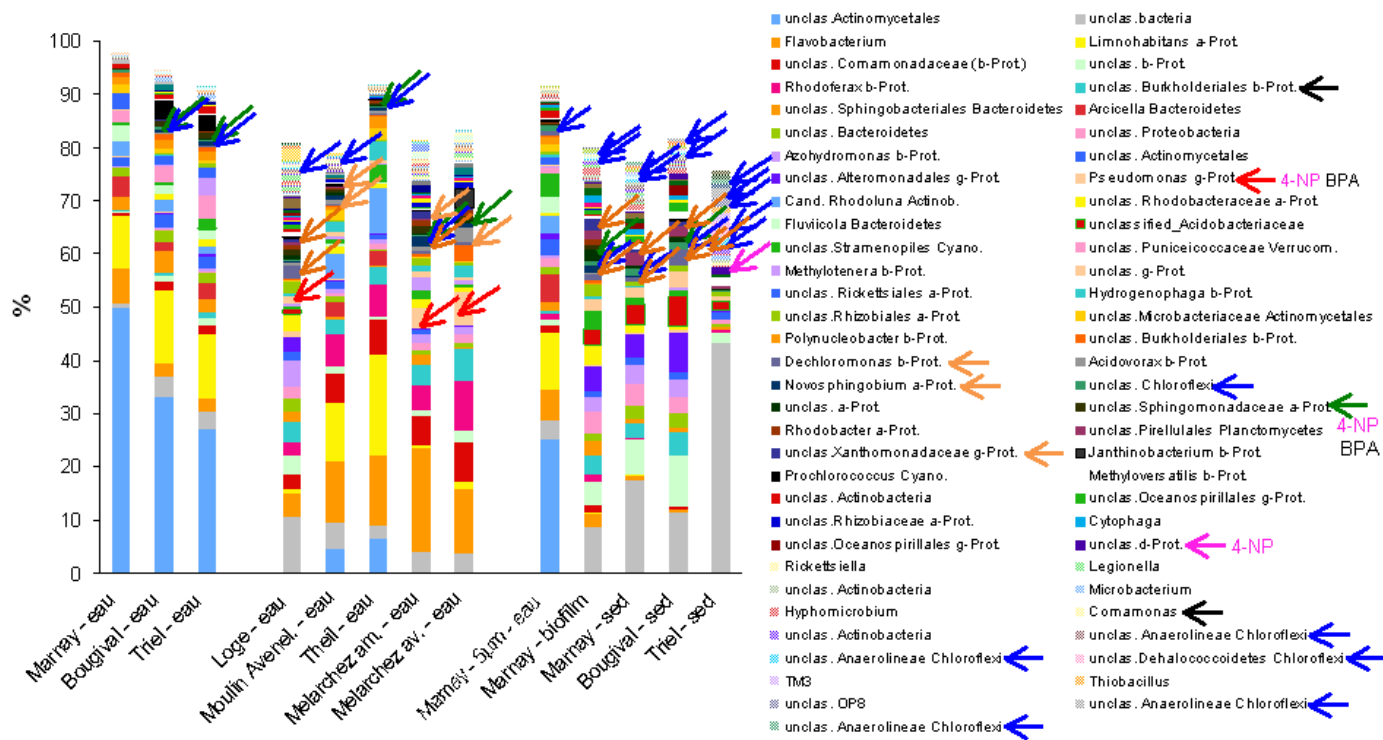


Figure 7 : Comparaison de l'abondance relative des différents genres bactériens dans l'eau et le sédiment de l'ensemble des stations échantillonnées en automne 2011. A Marnay, la fraction de la communauté adsorbée sur les particules dans la colonne d'eau et le périphyton (biofilm) ont également été analysés. Les flèches représentent des genres associés dans la littérature à la dégradation de polluants organiques divers.

4. Expériences « batch » en laboratoire

Afin de vérifier si des bactéries tolérantes aux polluants et/ou dégradatrices de ceux-ci avaient pu être sélectionnées dans les sites situés en aval de l'agglomération parisienne et donc soumis à une forte pression chimique, nous avons réalisé une série d'expériences de contamination artificielle de l'eau et des sédiments du site de Triel (à priori le plus pollué) avec du BPA et/ou du 4-NP (concentration = 1 mg/l) (Figure 8). En raison de leur faible solubilité, les polluants ont d'abord été dissous dans de l'acétone et nous avons laissé celui-ci s'évaporer pendant plusieurs heures. Les microcosmes ont ensuite été incubés à température du laboratoire pendant 28 jours et sous agitation (300 rpm). Nous avons mesuré au cours du temps le nombre de cellules /l par microscopie à épifluorescence, et l'activité exoprotéolytique de la communauté (hydrolyse du substrat fluorogénique leucine-β-naphthylamide). Des échantillons ont également été prélevés pour des analyses de diversité par la méthode Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (mesures prévues en 2013).

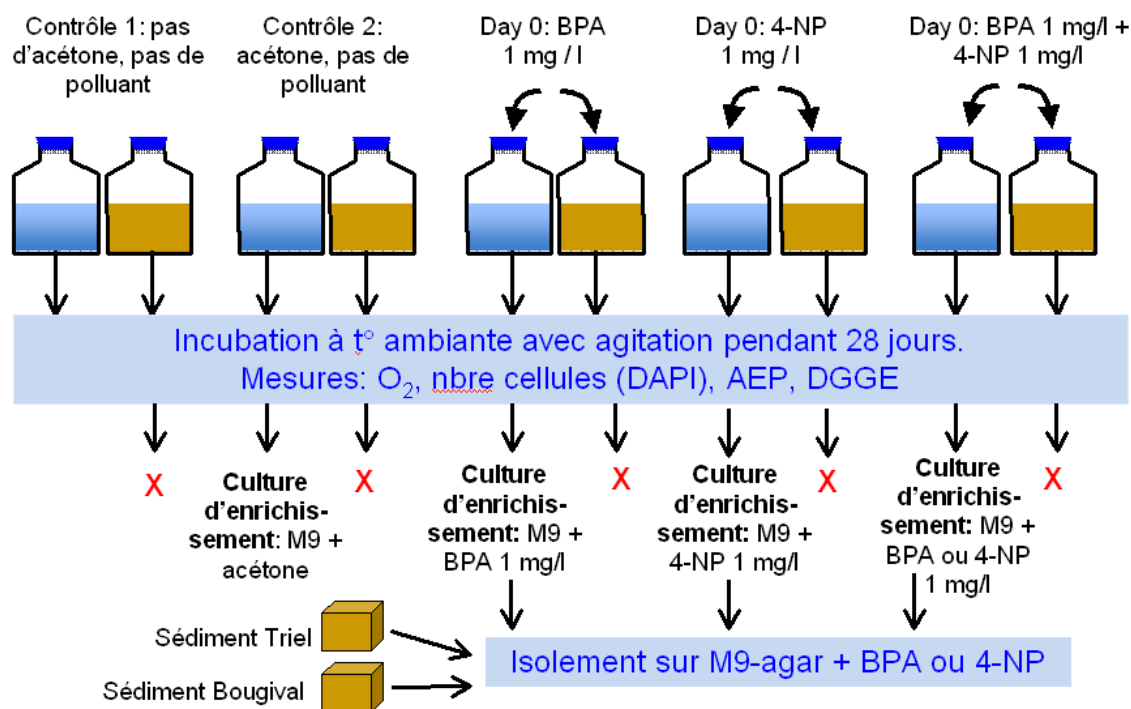


Figure 8 : Protocole de l'expérience de contamination artificielle de l'eau et des sédiments de Triel avec 1 mg BPA/l et/ou 1 mg 4-NP/l, suivie d'une étape de culture d'enrichissement en milieu minimum contenant les polluants comme seule source de carbone. Cette expérience a été complétée par un étalement direct de sédiment des sites en aval de Paris (Bougival et triel) afin d'isoler des souches dégradatrices de BPA et 4-NP.

Aucune croissance microbienne n'a été mesurée dans les microcosmes contenant des slurries (mélange 20% sédiment de Triel – 80% milieu minimum M9). Dans les microcosmes « eau de Triel », malgré une évolution des communautés assez inattendue (un pic d'abondance inexplicable au jour 4 et une augmentation significative de l'abondance et de l'activité microbienne dans le microcosme ne contenant que de l'acétone), des bactéries tolérantes au BPA et/ou au 4-NP se sont développées pendant le mois d'incubation (Figure 9).

Un petit volume de ces microcosmes a alors servi à inoculer des cultures d'enrichissement en milieu minimal (M9) incubées pendant 14 jours à 25°C, qui ont ensuite été étalées sur milieu gélosé contenant du M9 et le polluant (BPA ou 4-NP) comme seule source de carbone. Nous avons ainsi obtenu une centaine de souches (dont certaines sont très probablement identiques) capables d'exploiter le BPA ou le 4-NP comme seule source de C en aérobiose. Par ailleurs, des étalements de sédiments de Bougival et Triel sur le même type de milieu (additionné de sulfates) nous a permis d'isoler environ 85 colonies capables d'exploiter le BPA ou le 4-NP en anaérobiose. Ce résultat est remarquable vu le peu de données disponibles dans la littérature sur la dégradation de ces polluants en l'absence d'oxygène. En conclusion, des bactéries dégradatrices ont bien été sélectionnées par la forte pression chimique présente à Triel.

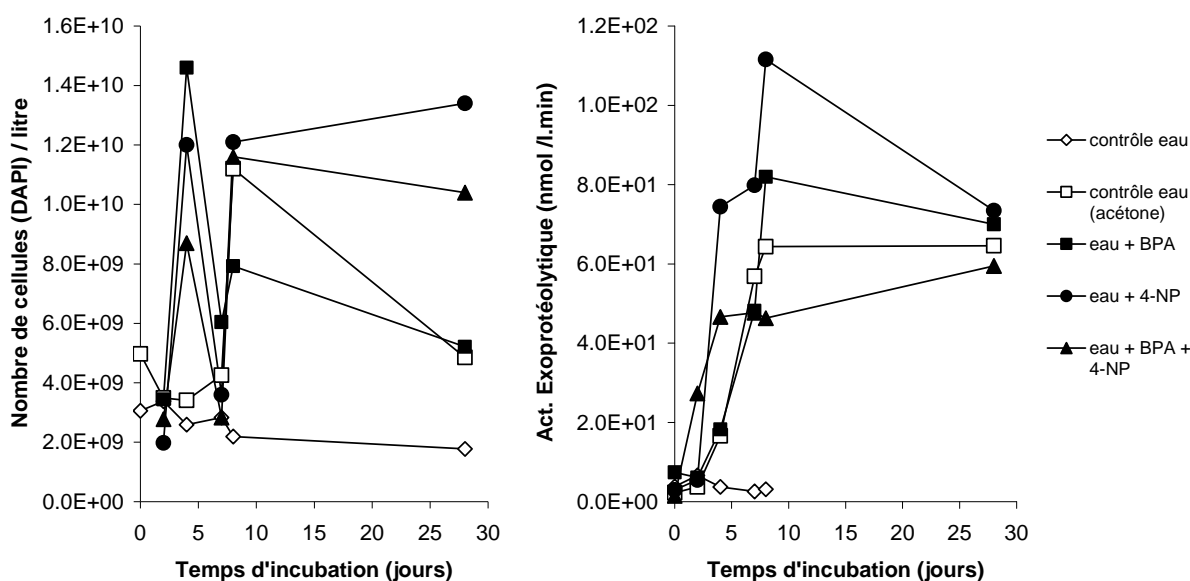


Figure 9 : Evolution du nombre de cellules et de l'activité exoprotéolytique dans les microcosmes d'eau de Triel incubés pendant 28 jours au laboratoire en présence et en absence de BPA et 4-NP.

5. Perspectives

Nos objectifs pour l'année 2013 sont:

- d'analyser la diversité microbienne des échantillons récoltés lors de la troisième campagne d'échantillonnage (décembre 2012) -> *observe-t-on des tendances récurrentes dans la structure des communautés analysées pendant ces trois campagnes?* (ESA)
- de réaliser une analyse globale (type MDS) de la structure des communautés microbiennes en lien avec les paramètres physico-chimiques des trois campagnes -> *certaines paramètres environnementaux (dont les concentrations en polluants) peuvent-ils expliquer la structure des communautés bactériennes?* (ESA)
- de mieux caractériser la dynamique des communautés microbiennes dans les microcosmes (analyse DGGE des changements de diversité pendant l'incubation) et identification des souches dégradatrices isolées sur milieu gélosé -> *quelles espèces ont proliféré dans ces microcosmes? Sont-elles identiques aux espèces isolées sur milieu gélosé?* (ESA)
- de poursuivre la recherche des gènes fonctionnels de résistance aux métaux dans les biofilms soumis à une pollution multi-métallique, et étudier l'expression de ces gènes par une approche transcriptomique basée sur l'ARN des communautés microbiennes (M2C, HBAN).

Références bibliographiques :

1. **Lear, G., Y. Dong, and G. Lewis.** 2010. Comparison of methods for the extraction of DNA from stream epilithic biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek* **98**:567–571.
2. **Margulies, M., et al.** 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**:376–80.
3. **Zhou, J., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**:316–22.

