Colloque annuel du PIREN-Seine
5 & 6 octobre 2017

Le résistome des sédiments et des biofilms est-il enrichi en gènes marqueurs de l'anthropisation de l'hydrosystème : intégrons cliniques ou gènes de résistance aux métaux (bassin versant de l'Orge et axe Seine : Marnay, Bougival, Triel) ?

Thierry Berthe, UMR M2C, Normandie Université

Un contexte sociétal

- La Directive Cadre sur l'Eau (DCE 2000/60/CE) du 23 octobre 2000 vise à atteindre le bon état écologique des masses d'eau d'ici 2015:
  - Niveau de contamination chimique
  - Impact écologique de la contamination
  - Développer de nouveaux indicateurs

- Rapport Carlet (groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques) : nécessité de suivre un marqueur de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement. JPI-AMR (déclinaison européenne).

Contexte scientifique : le résistome microbien, un marqueur d'anthropisation du bassin versant

Question: Réponse et adaptation des communautés microbiennes (1er maillon du réseau trophique) en relation avec les usages du bassin versant, à différentes échelles de temps et d'espace.

Notre approche consiste à:

(i) suivre des **marqueurs moléculaires** d'exposition aux ETM (gènes de résistance) et de dissémination de l'antibiorésistance (intégrons cliniques),

(ii) étudier la relation entre la diversité des communautés microbiennes et le niveau de contamination.

Les intégrons cliniques: marqueur moléculaire de la dissémination de l'antibiorésistance

Gène cible
*Int*I code pour une intégrase apparentée aux recombinases spécifiques de site et d'un site d'attachement *attI*

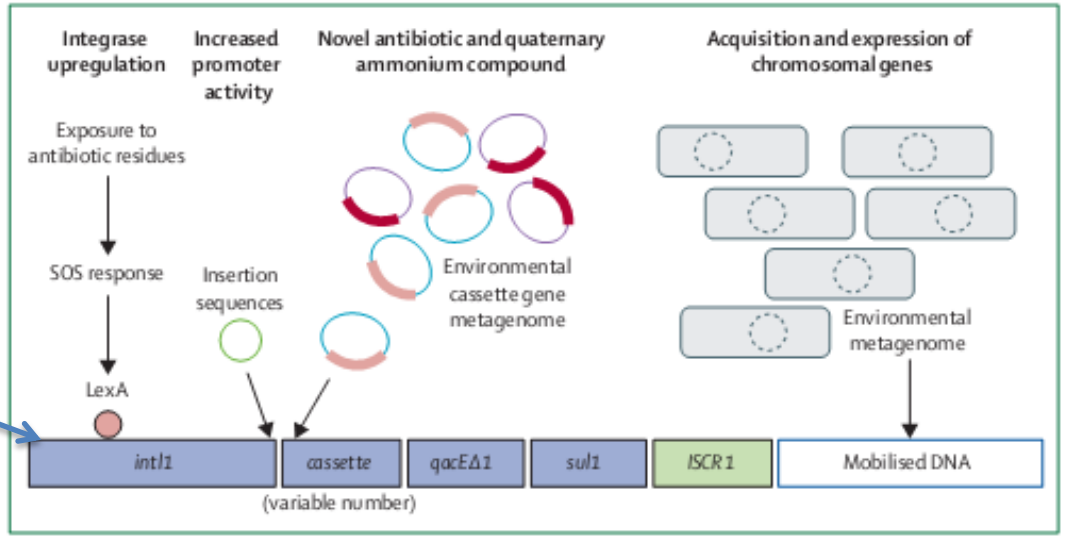


Figure 4: Resistance gene acquisition by integrons
Stress response via LexA inactivation leads to increased IntI1 expression, modulation of resistance gene expression via insertion sequence transposition, integration of antibiotic resistance genes (blue circles) and quaternary ammonium compound resistance genes (red circles), and transposition and expression of chromosomal resistance genes from the metagenome.

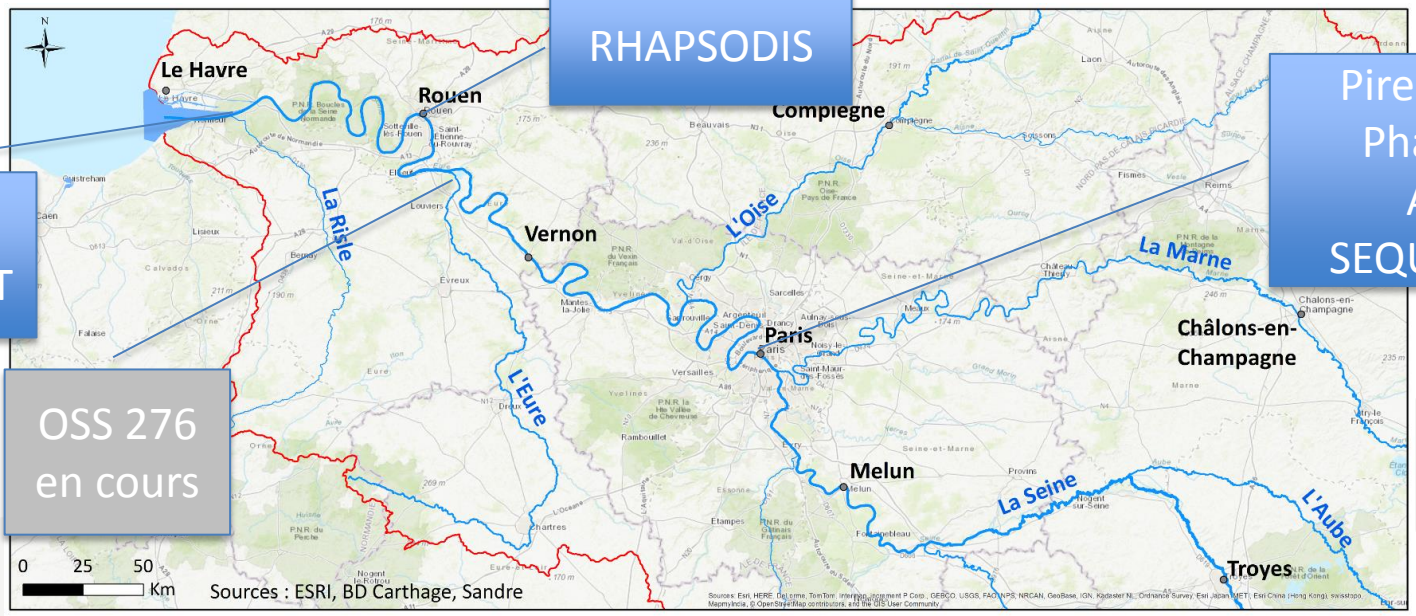
Wellington (Lancet, 2013)

- Éléments génétiques bactériens capables de promouvoir l'acquisition et l'expression de gènes (Stokes, 1989),
- Trois classes d'intégrons cliniques (*intI*), prés de 130 cassettes impliquées dans la résistance aux antibiotiques,
- Les intégrons peuvent être liés à des éléments génétiques porteurs de gènes de résistance aux ETM.

Les gènes de résistance aux métaux traces: marqueurs moléculaires de l'exposition des communautés aux ETM

ETM	Mécanisme	Gène cible	Données de contamination/Site
Co	Pompe à efflux (HME-RND)	*czcA*	Orge (Le Pape, 2012) Seine (Meybeck et al, 2007; Fechner et al, 2012)
Zn			Orge (Le Pape, 2012) Seine (Meybeck et al, 2007; Fechner et al, 2012)
Cd			Seine (Meybeck et al, 2007; Fechner et al, 2012)
Cu	Pompe à efflux (HME-RND)	*cusA*	Orge (Le Pape, 2012) Seine (Meybeck et al, 2007; Fechner et al, 2012)
Ag	Pompe à efflux (HME-RND)	*silA*	Seine (Ayrault et al, 2010)
Hg	Changement de spéciation	*merA*	En cours

Une démarche à l'échelle du bassin versant de la Seine



VANA: référence (Guyane)

Principaux acquis

(i) **Archive sédimentaire** → le résistome microbien et la diversité des communautés microbiennes reflètent l'historique (40 années) de la contamination métallique et organique (**RHAPSODIS, GIP-SA; *OSS 276***). Kaci et al, 2014 et 2016.

(ii) **Eau et sédiments de l'estuaire** → vulnérabilité des eaux/sédiments de surface mais aussi résilience des sédiments de l'estuaire de Seine à la contamination par des antibiotiques et les souches d'*E. coli* antibiorésistantes d'origine hospitalière ou animale (**FLASH et DYNAPAT, GIP-SA**). Oberlé et al, 2012. Leclerc et al, 2013 ; Berthe et al, 2008 et 2013 ; Petit et al, 2017.

(iii) **Biofilms** → approche mésocosme montre une réponse adaptative des microorganismes

(i) *à l'échelle de la communauté*: sélection de genres adaptés à des milieux contaminés en ETM,

(ii) *à l'échelle de la cellule*: occurrence de gènes de résistance aux ETM (**Piren Phase 6, ANR SEQUADAPT**).

Objectifs

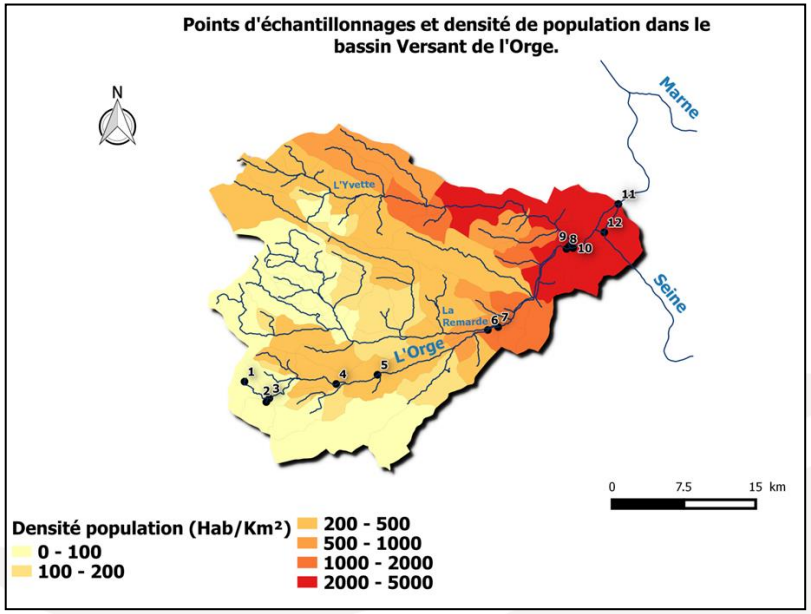
→ Occurrence de marqueurs de l'anthropisation dans les biofilms et sédiments de l'orge et de l'axe Seine

(i) gènes de résistance aux métaux traces

(ii) intégrons cliniques de classe 1, 2 et 3

(iii) comparaison de biofilms végétaux vs. membrane (cagettes, phase 6 Piren et ANR Sequadapt)

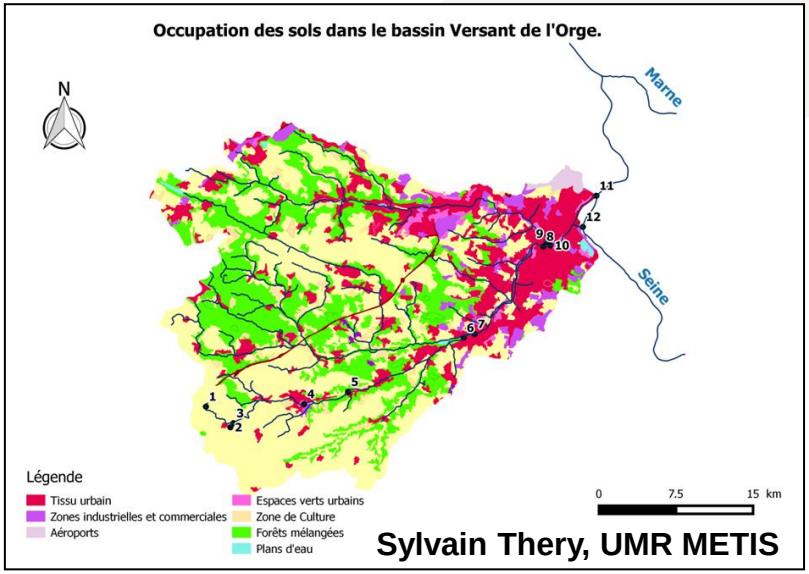
Stratégie échantillonnage – Bassin versant de l'Orge



Bassin versant de l'Orge: forte pression anthropique avec occupation sol sectorisée → **zone rurale** (45% agriculture, 31% forets) et **zone urbaine** 23% territoire.

6 stations échantillonnées dans l'Orge (06/17):

3- Saint Martin de Bréthencourt
4- Dourdan
5- Sermaise
7- Saint-Germain-lès-Arpajon
10- Savigny Sur Orge
12- Viry-Châtillon
T°C: 13°C à 21°C



Sylvain Thery, UMR METIS

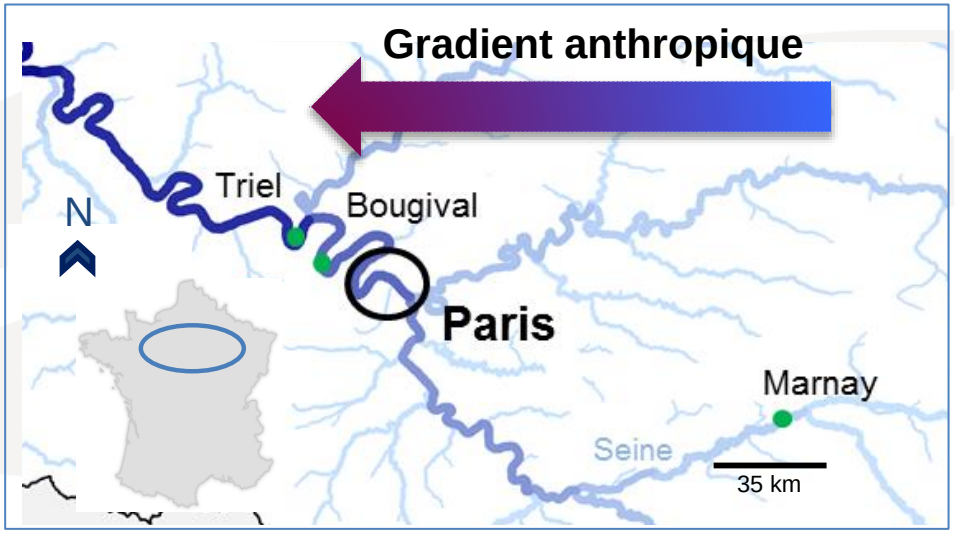
(1) Sédiment
(2) Biofilm sur végétaux

Stratégie échantillonnage – Axe Seine

Biofilms se développant sur des membranes LPDE (4-6 semaines)

(1) Biofilm sur membrane (cagette)

Marnay, Bougival, Triel (09/11, 04/12, 07/12)

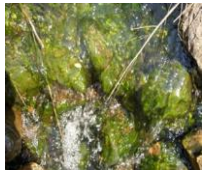


(2) Biofilm sur végétaux

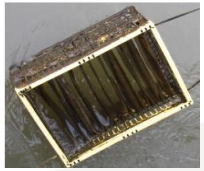
Marnay, Bougival, Triel (06/17)
T°C: 16°C à 21°C

Approche méthodologique

Biofilm périphytique



1- Biofilms sur végétaux
Marnay, Bougival, Triel (06/17)
Continuum bassin versant de l'orge (06/17)



2- Biofilms sur membrane LDPE
Marnay, Bougival, Triel (09/11, 04/12, 07/12)

Sédiment

Continuum bassin versant de l'orge (06/17)

Extraction acides nucléiques
(Qiagen DNeasy PowerSoil , trois ou deux réplicats biologiques)
Démarche qualité des procédures (PCR _ADNr 16S)

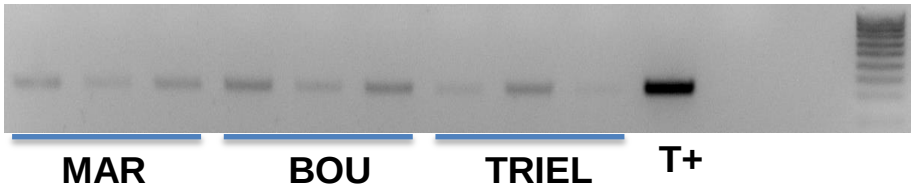
Intégrons cliniques de classe 1, 2 et 3 (qPCR)
Stalder et al, 2014

Gènes de résistance aux métaux traces *czcA*, *silA* et *cusA*
Woods et al, 2009; Roosa et al, 2014

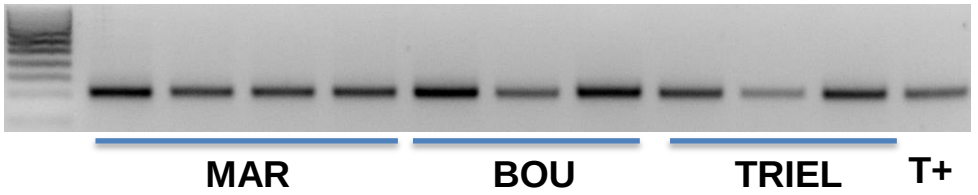
Observation des biofilms sur végétaux: MEB

Occurrence du gène *czcA* (Co, Zn et Cd) dans les sédiments et biofilms: axe Seine et l'Orge

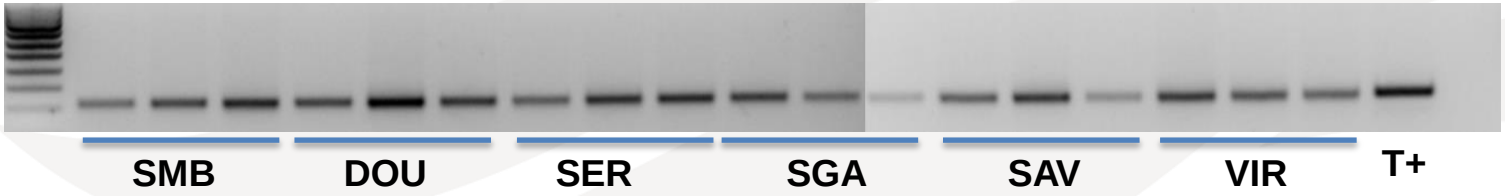
Biofilms végétaux (Seine)



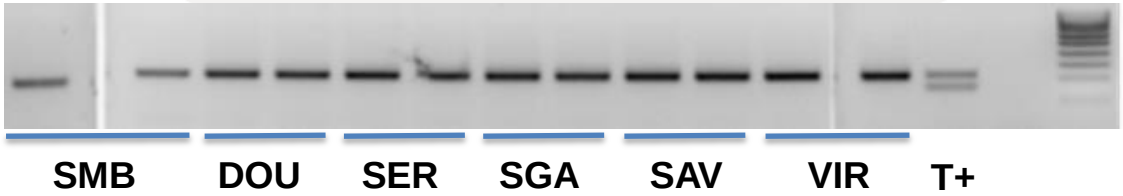
Biofilms membranes (Seine)



Biofilms végétaux (Orge)



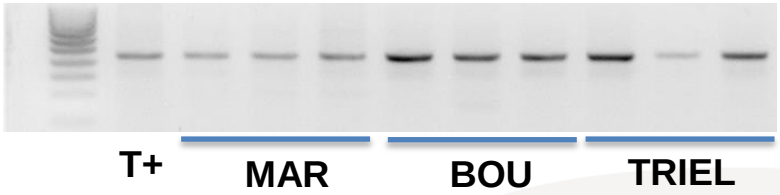
Sédiments (Orge)

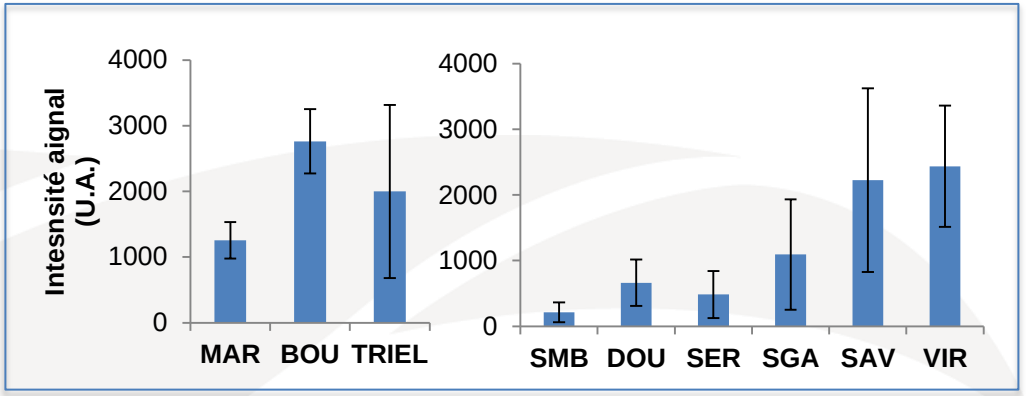


- Présence permanente du gène *czcA* qui traduit une exposition (et une capacité adaptation) des communautés microbiennes à l'un de ces ETM
- Cohérence avec la contamination en Co observée dans l'Orge (MES; Le Pape, 2013) et sur l'axe Seine (Marnay, Bougival, et Triel; Fechner et al, 2012).

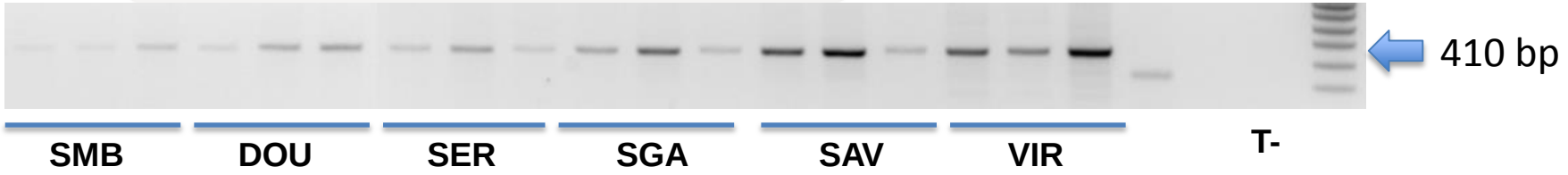
Occurrence du gène *cusA* (Cu) dans les biofilms: axe Seine et l'Orge

Biofilms membrane (Marnay, Bougival et triel)



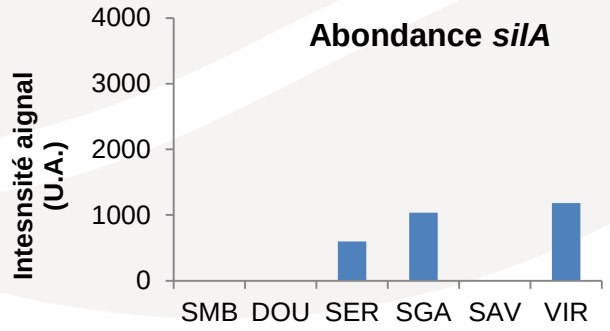
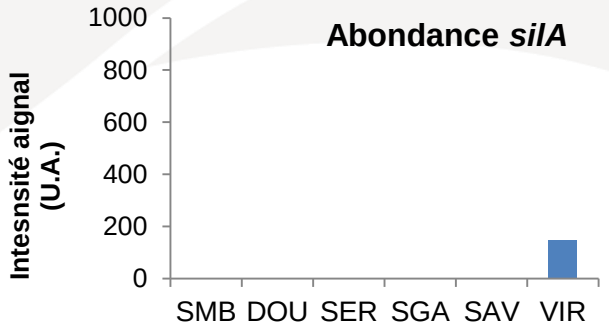


Biofilms végétaux – BV de l'Orge



- Augmentation de l'abondance du gène *cusA* le long des deux continuums. Exposition et adaptation des communautés bactériennes au Cu.
- Cohérent avec l'enrichissement du Cu observé dans le BV de l'Orge (Le Pape, 2013) et au niveau de Bougival et Triel (Fechner et al, 2012).

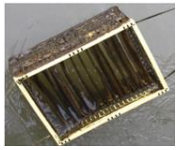
Occurrence du gène *silA* (Ag): axe Seine et l'Orge

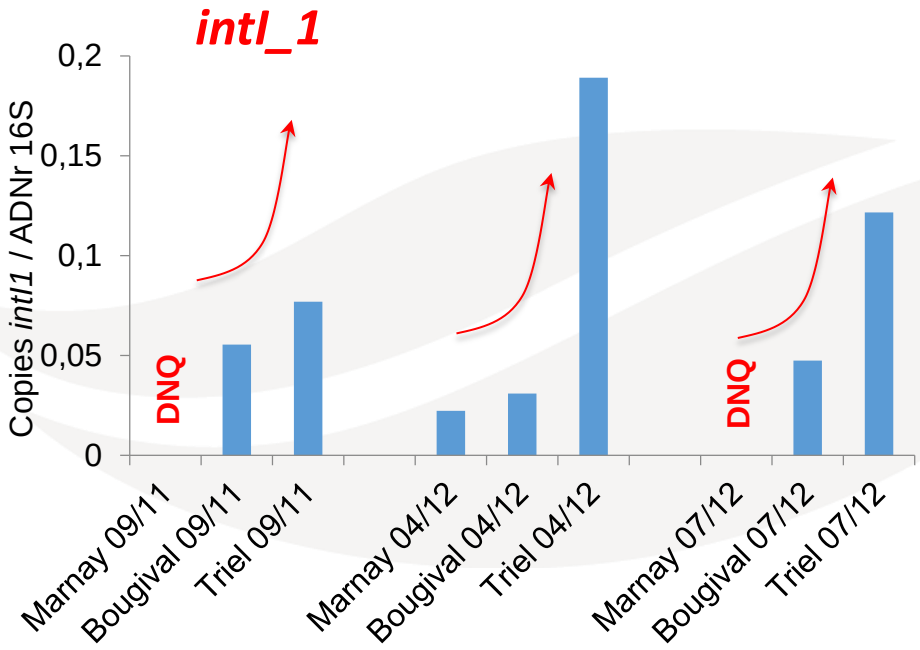
	Biofilms	Sédiments
Seine	Absence de *silA* dans biofilms membrane et végétaux	Détection de *silA* dans sédiments de Marnay, Bougival et Triel (2011 et 2012; Phase 6 Piren)
Bassin Versant Orge		

- **Axe Seine**: absence du gène *silA* dans les biofilms mais présence sédiments. Biodisponibilité des métaux dans le biofilm vs sédiment?
- **BV de l'Orge**: détection plus importante dans les biofilms comparativement sédiments. Abondance *silA* augmente avec la pression anthropique.

Dissémination de l'antibiorésistance: présence d'intégrons dans les biofilms et sédiments de l'axe Seine

Biofilms membrane

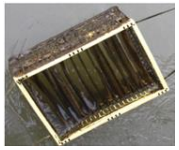


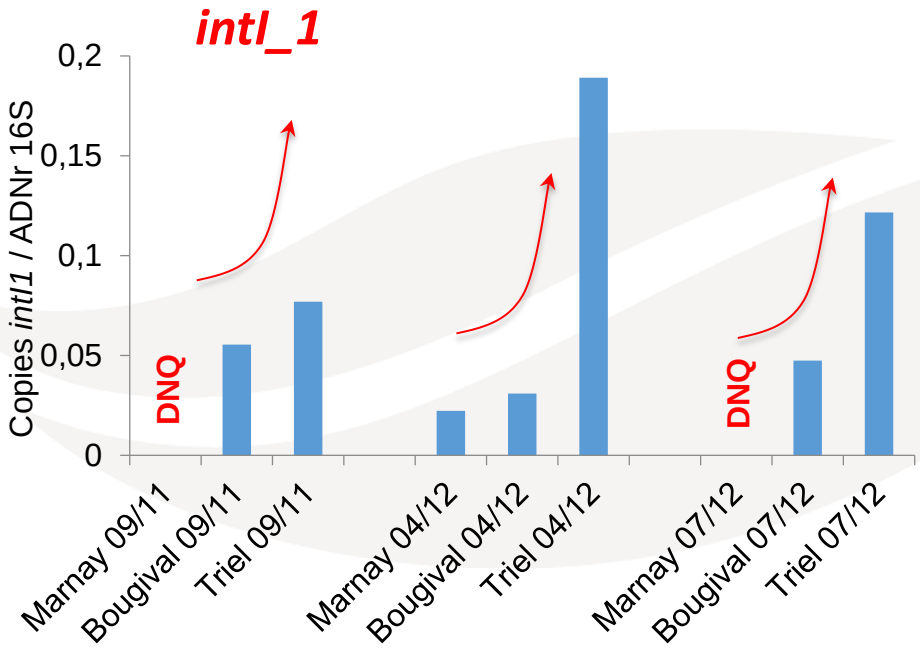


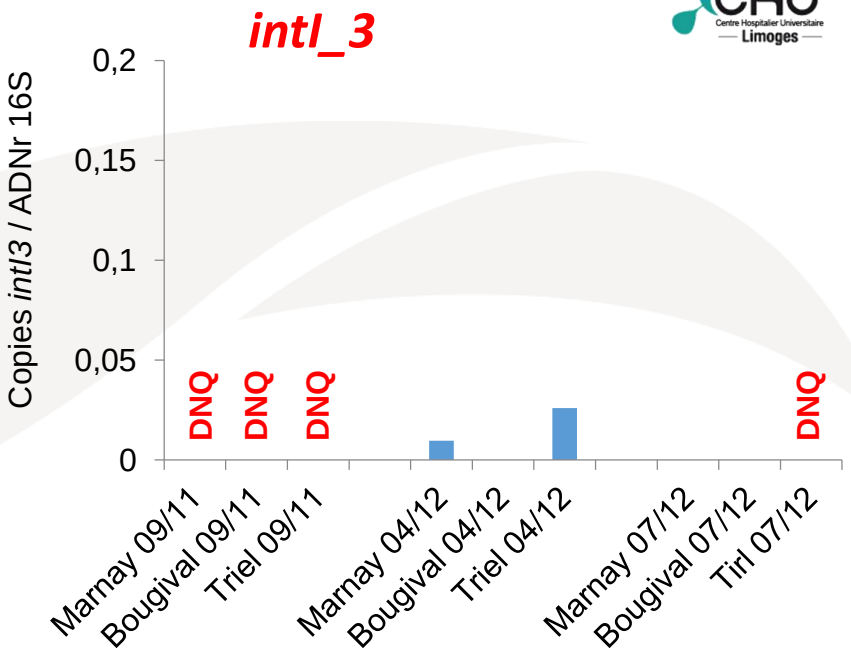
- Augmentation de l'abondance relative des intégrons de classe 1 en fonction de la pression anthropique dans la Seine. Effet Saisonnier observé (prescription d'ATB en fonction des périodes épidémiologiques).
- Triel: abondance relative des *intI_1* est comparable à celle d'effluents de STEU, effluents urbains (Stadler et al, 2014).

Dissémination de l'antibiorésistance: présence d'intégrons dans les biofilms et sédiments de l'axe Seine

Biofilms membrane

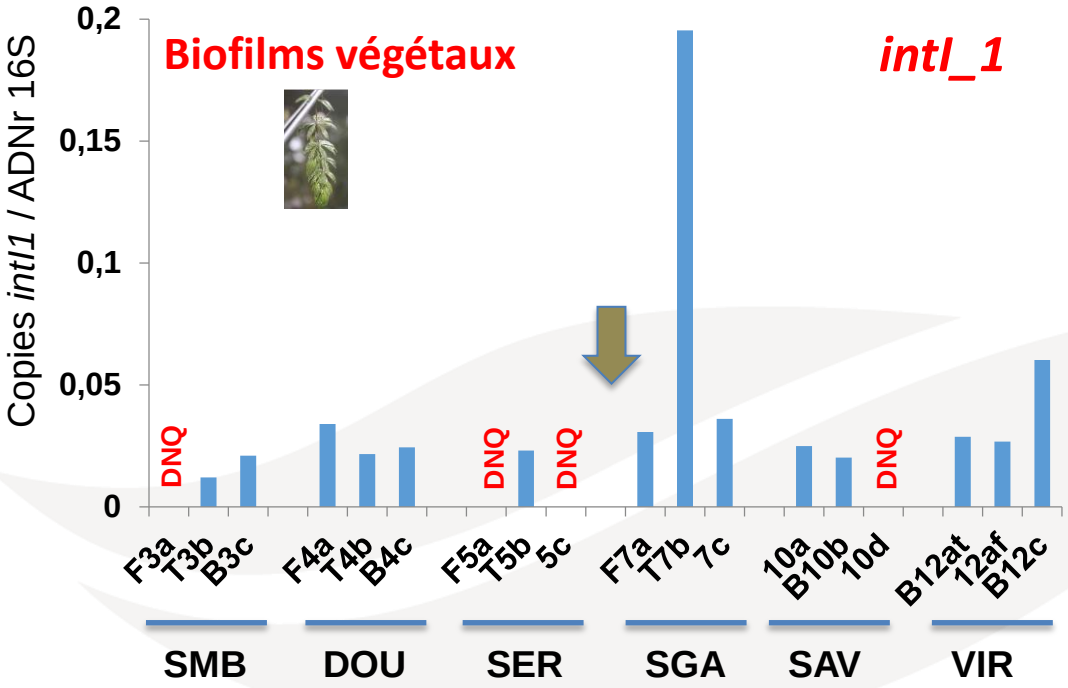






- Absence intégrons cliniques de classe 2
- Abondance relative des intégrons *intI_3* est plus faible (Stadler et al, 2017; Laroche et al, 2009). Abondance plus importante à Triel quand *intI_3* quantifiable.
- Les biofilms fixent les souches portant les intégrons cliniques.

Dissémination de l'antibiorésistance: présence d'intégrons dans les biofilms et sédiments de l'Orge

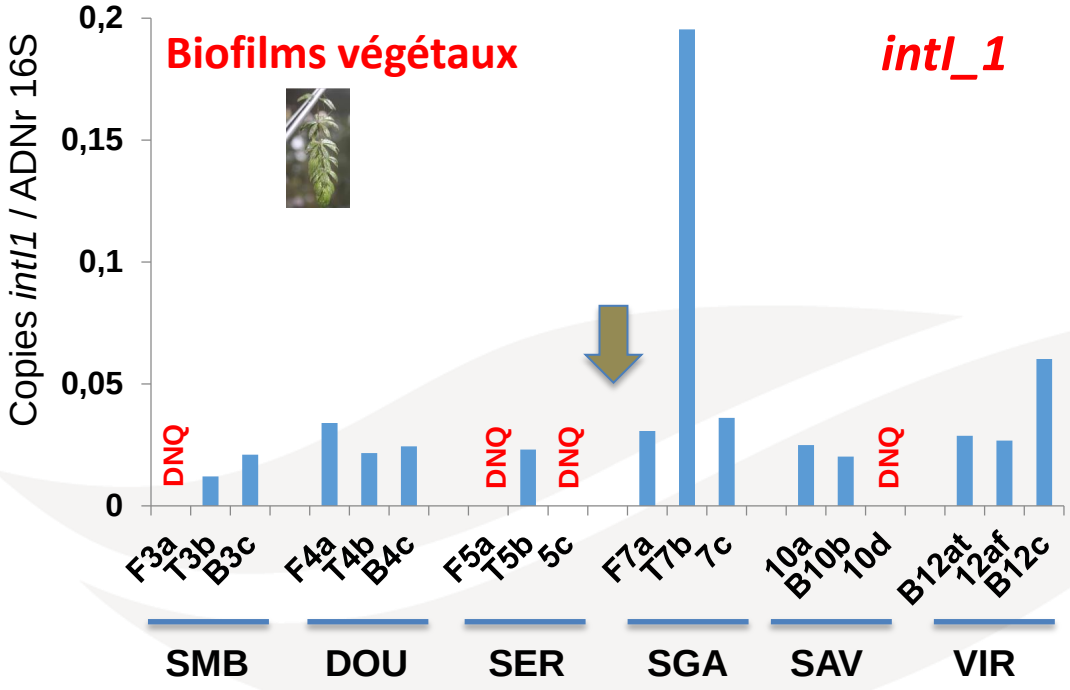


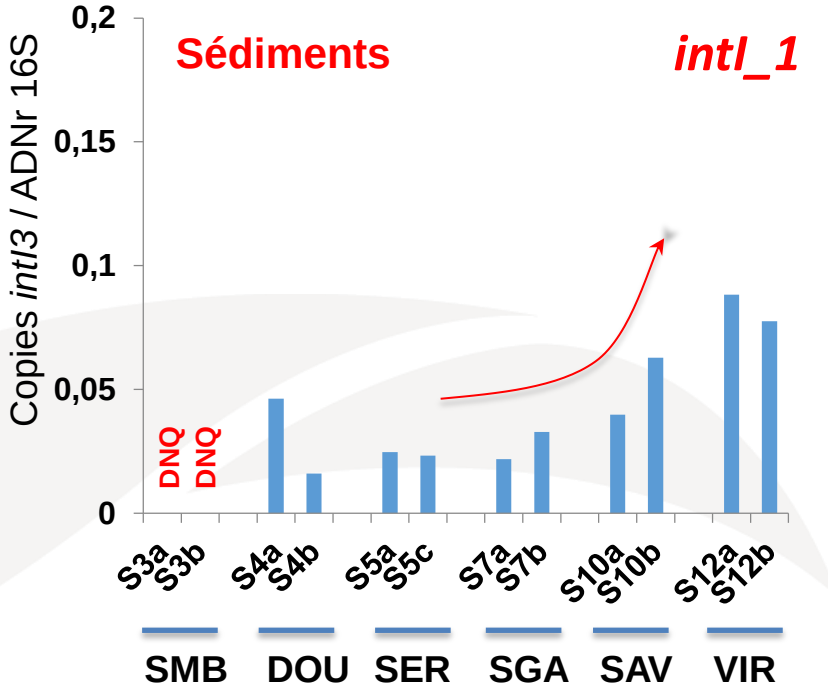
SMB _Saint Martin de Béthencourt
DOU_ Dourdan
SER_Sermaise
SGA_ Saint-Germain-lès-Arpajon
SAV_ Savigny Sur Orge
VIR_ Viry-Châtillon

Biofilms végétaux

- Présence d'intégrons de classe 1 en tête de bassin versant. Pas effet cumulatif à l'échelle spatiale.
- Abondance relative élevée sur les biofilms de SGA (apport ATB par Rémarde (Prédecelle/Charmoise); Dinh et al, 2017).
- Périphytons diffèrent suivant support? Contre-sélection des communautés microbiennes?

Dissémination de l'antibiorésistance: présence d'intégrons dans les biofilms et sédiments de l'Orge



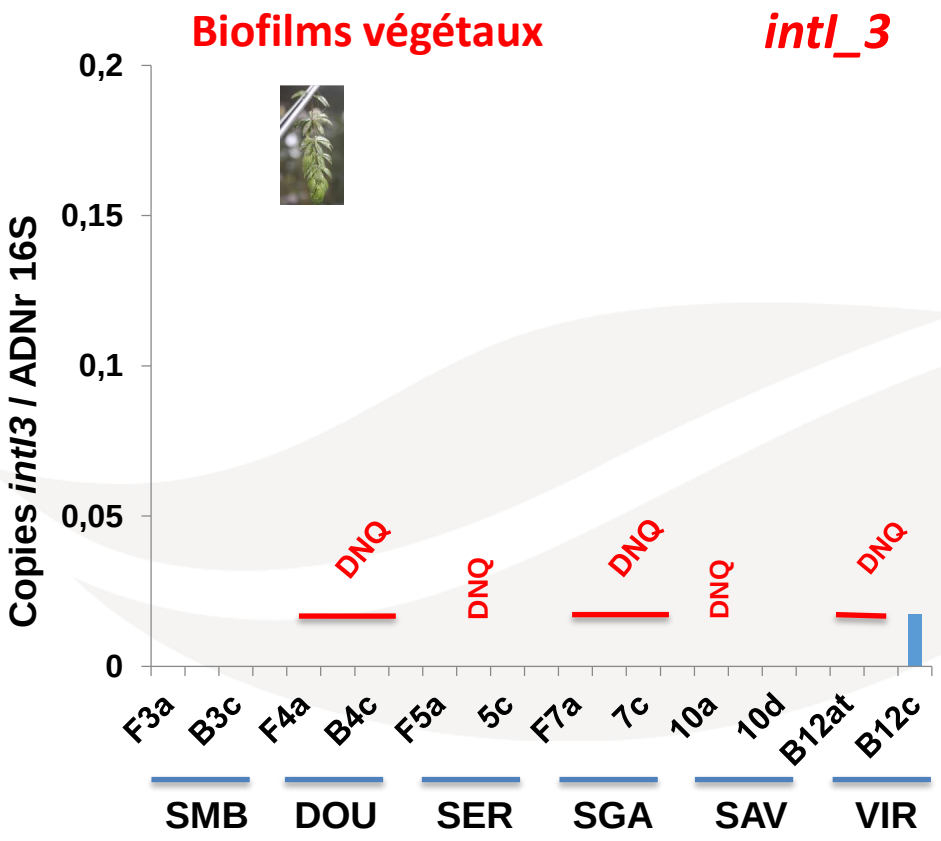


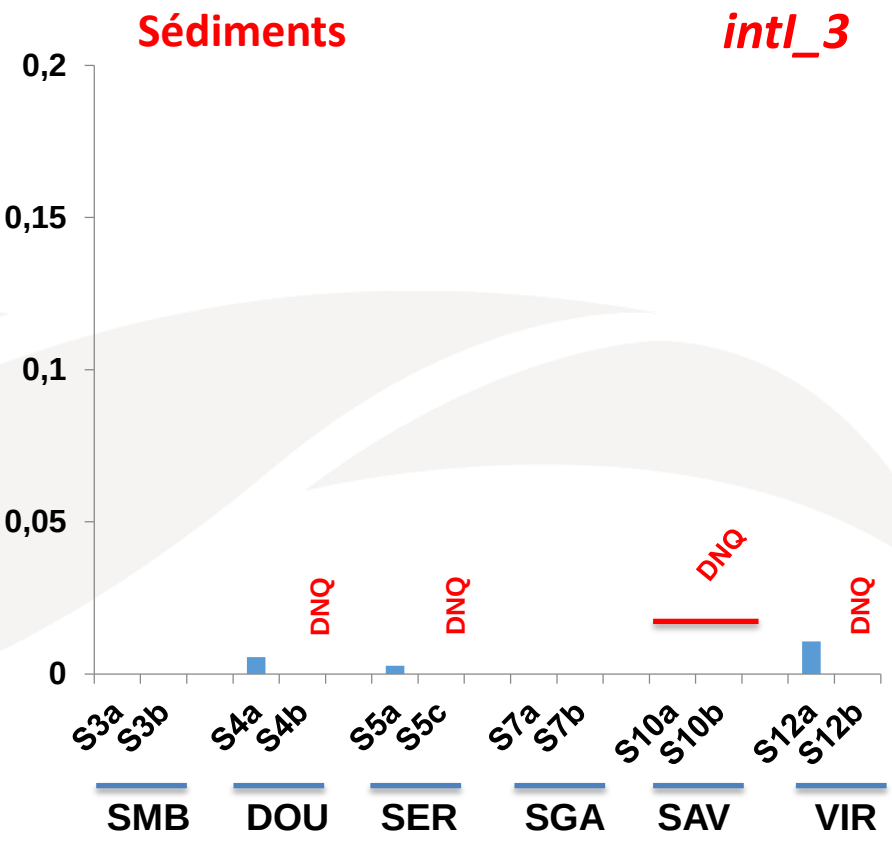
SMB _Saint Martin de Béthencourt	**SGA**_ Saint-Germain-lès-Arpajon
DOU_ Dourdan	**SAV**_ Savigny Sur Orge
SER_Sermaise	**VIR**_ Viry-Châtillon

Sédiments

- Augmentation abondance *intI1* le long du continuum qui s'explique par la pression anthropique (densité humaine, hôpitaux, STEU).

Dissémination de l'antibiorésistance: présence d'intégrons dans les biofilms et sédiments de l'Orge

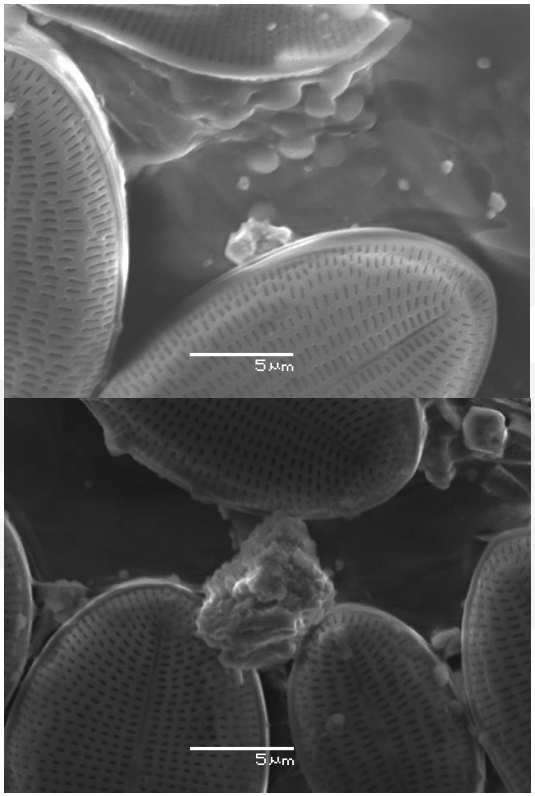




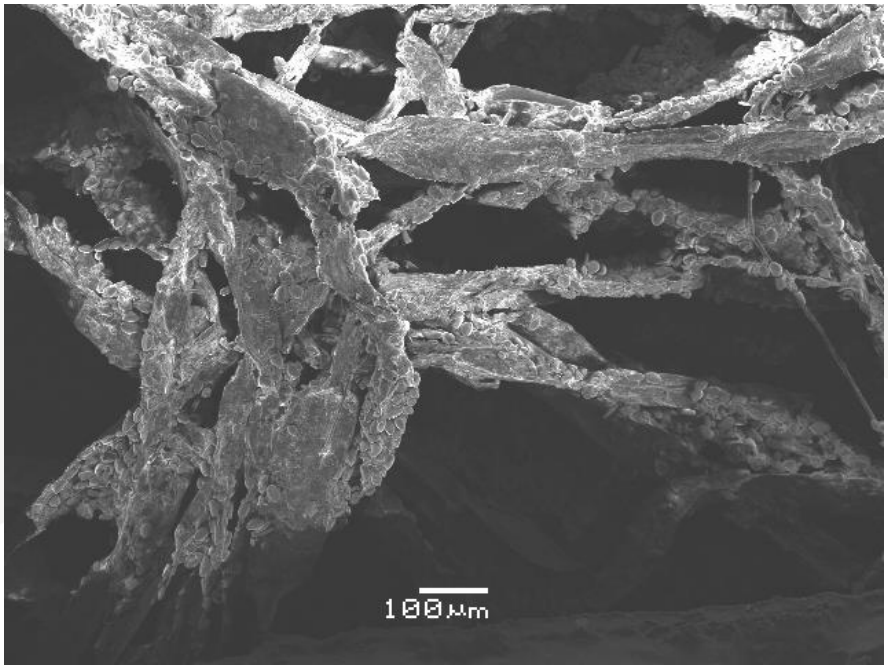
- Absence d'intégrons de classe 2
- Faible occurrence d'intégrons de classe 3 (souvent détectés mais non quantifiables). Pas de différence entre les communautés microbiennes du sédiment et biofilms végétaux.

Structure des biofilms périphytiques (Marnay, Bougival)

Biofilm végétal_Marnay (06/17)



Biofilm végétal_Bougival (06/17)



- Présence importante de micro-algues au sein d'un biofilm qui se développe sur les végétaux à Marnay et Bougival.
- Comparaison avec des biofilms sur minéraux (Projet Anses PANDORE, 2018-2020).

Conclusions / Perspectives

- Présence des intégrons cliniques dans les biofilms et sédiments de surface:
  - ✓ Abondance reflète la pression anthropique / usage saisonnier des ATB à l'échelle d'un BV. Quelle persistance?
- Réponse et adaptation des microorganismes à une exposition métallique:
  - ✓ occurrence des gènes de résistance (*czcA*, *cusA* et *silA*) montre que les microorganismes sont exposés à des concertations toxiques (Co, Zn, Cd, Cu, Ag). Temps de maintien?
- Sédiments + biofilm sur membrane (cagettes) semblent plus intégrateurs dans le temps que les biofilms végétaux.

- Effet saisonnier: trois autres campagnes prévues sur l'Orge/Axe Seine.
- Biofilms végétaux vs associés au biote (poisson) et minéraux. Positionnement de trappes à sédiments.
- **Cartographie des marqueurs moléculaires à l'échelle des continuums en relation avec les données environnementale (hydrologie, usage).**

Merci de votre attention

Thierry Berthe [1], Lise Fechner [2], Olivier Barraud [3], Christophe Dagot [3], Marie Cécile Ploy [3], Manon Michaut [1], Flora Cotelle [1], Margaux Gaschet [3], Fabienne Petit [1]

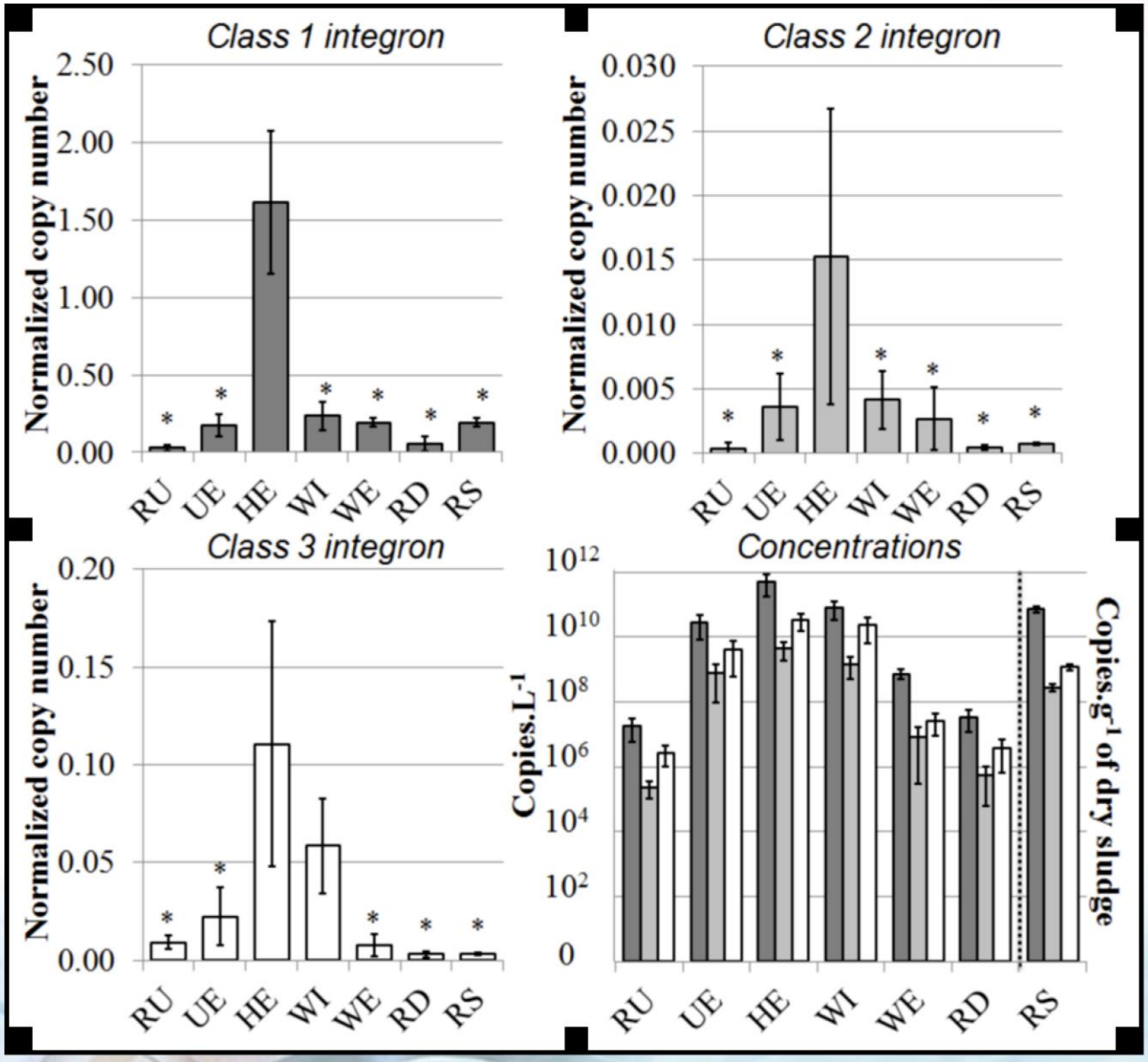
[1] UMR CNRS 6143 M2C, Normandie Université

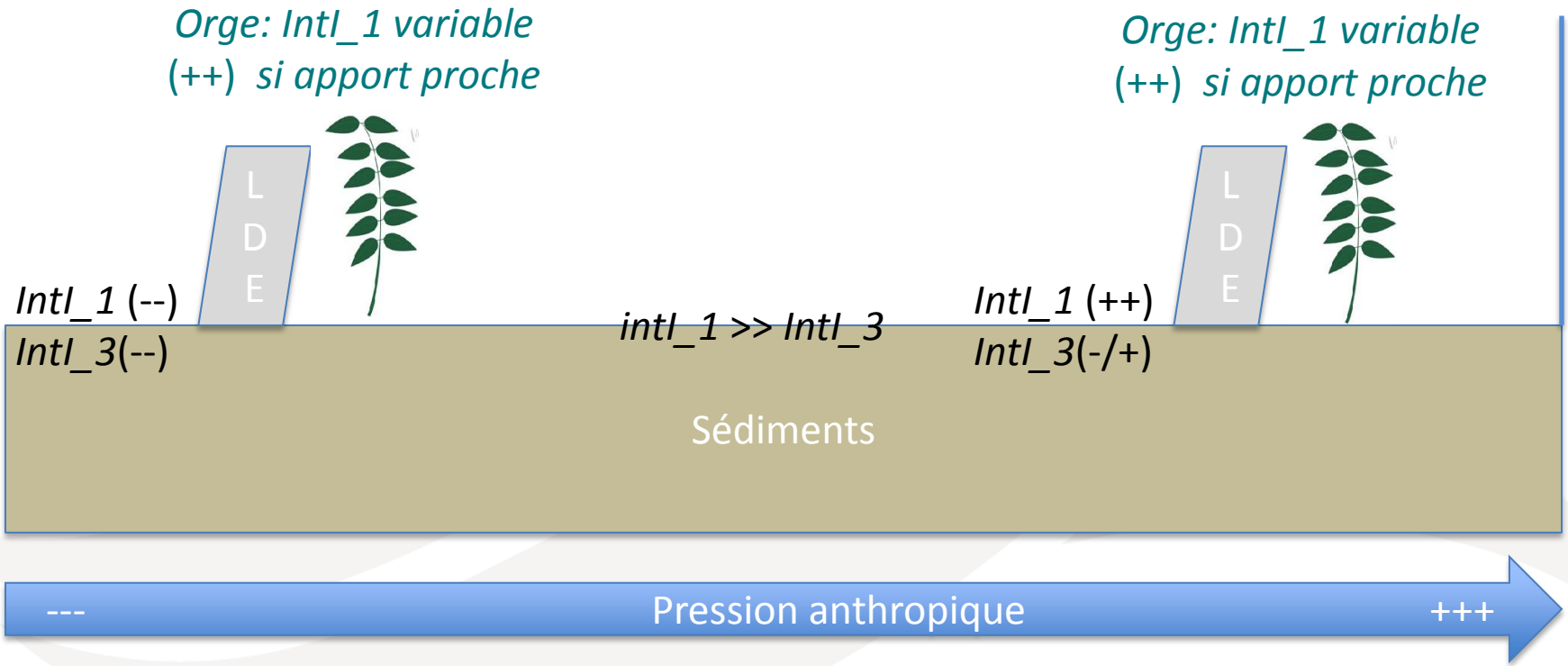
[2] IFREMER, Issy-Les-Moulineaux

[3] INSERM S-1092, Limoges

PiREN Seine

Abondance relative en intégrons (nbre copy intl / nbre de copies d'ADN codant l'ARN16S)





czcA (Co, Zn, Cd) — Présence ++ dans les sédiments + deux types de biofilm

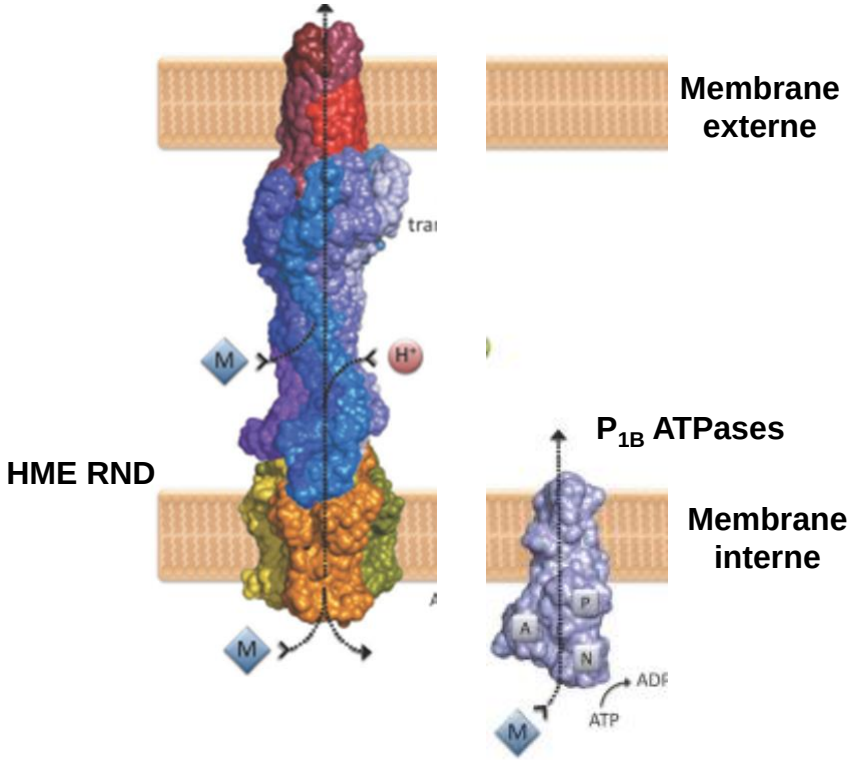
cusA (Cu) — (--) Biofilms naturels (Orge) et artificiels (Seine), Sédiments? (++)

silA (Cu) — (--) Biofilms naturels et sédiments –BV Orge (+)

APPROCHE METHODOLOGIQUE

Mécanismes de résistance aux métaux traces ciblés

Mécanismes d'efflux



Cobalt / Zinc / Cadmium
czcA (HME RND)

Cuivre
cusA (HME RND)
copA (P_{1B} ATPases)

Argent
silA (HME RND)

Cadmium / Zinc
cadA (P_{1B} ATPases)

Changement de spéciation de l'ion métallique

MerA

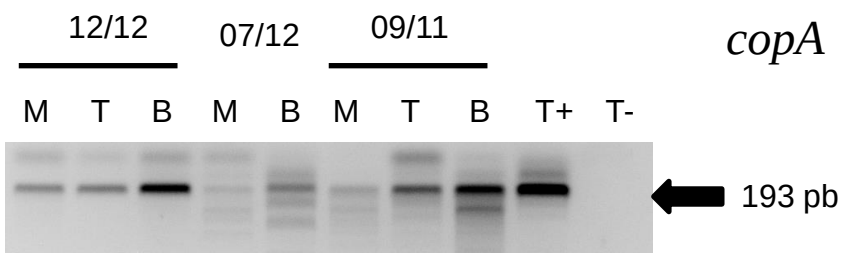
$Hg(II) + NADP(H) \rightarrow Hg(0) + NADP^+ + H^+$

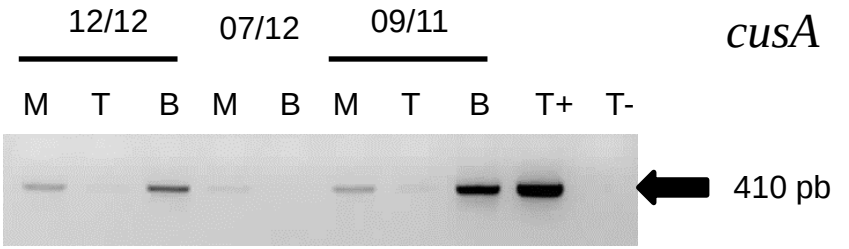
Mercure
merA (β/γ *Proteobacteria*)
merA (*Actinobacteria*)

RESULTATS

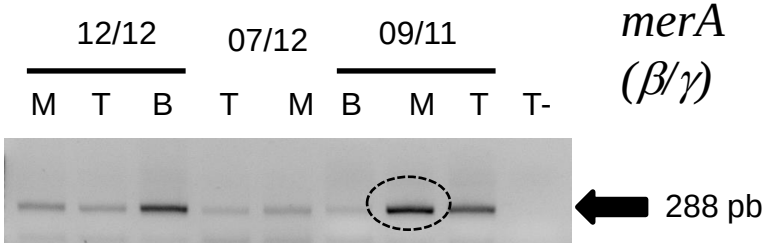
Occurrence de gènes de résistance aux métaux traces dans les sédiments

Résistance au cuivre

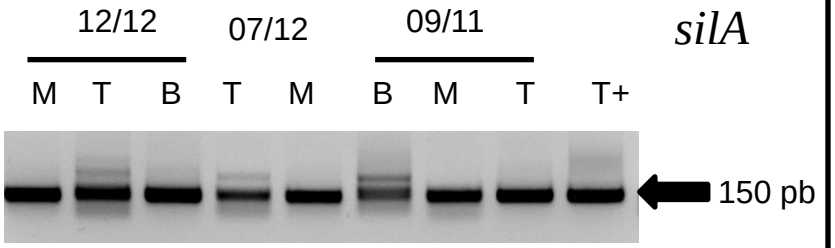




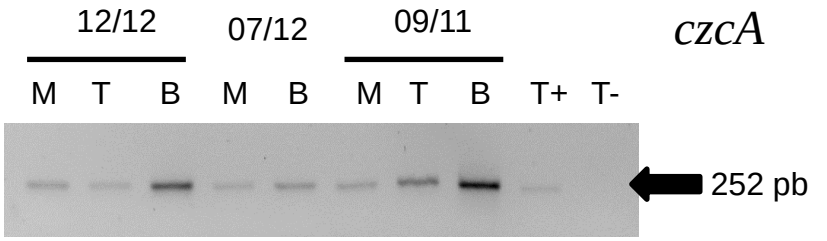
Résistance au mercure



Résistance à l'argent



Résistance cadmium/cobalt/zinc



✓ Occurrence de gènes de résistance aux métaux traces à l'exception de *cadA* et *merA* (*Actinobacteria*)

✓ Pas d'effet saisonnier marqué, amplification plus importante à Bougival et Triel (à confirmer par qPCR)