

Développement d'outils biologiques de suivi de la qualité des rejets de stations d'épuration et de la Seine

Sadia BAGAGNAN

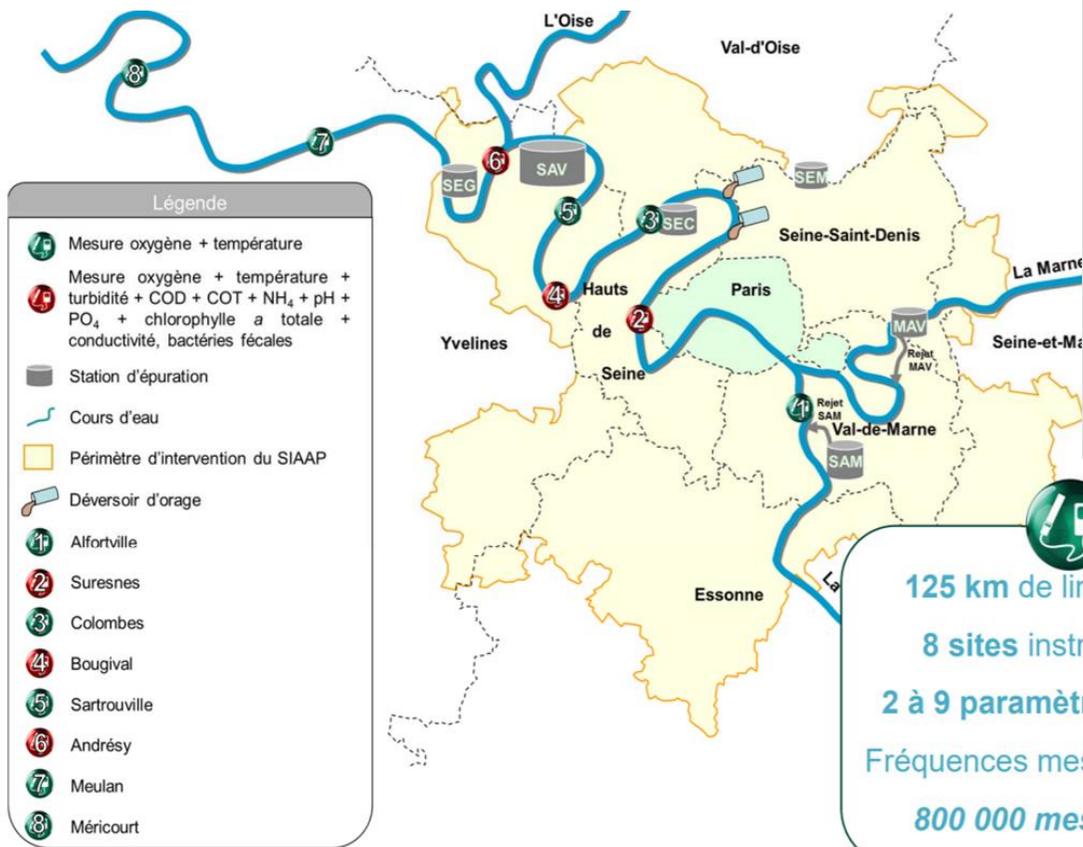
Encadrée par :
Régis MOILLERON
My Dung JUSSELME
Sabrina GUERIN

CONTEXTE ET OBJECTIFS

CONTEXTE ET OBJECTIFS

CONTEXTE

MeSeine : Mesures en Seine



125 km de linéaire suivi
8 sites instrumentés,
2 à 9 paramètres mesurés
Fréquences mesures élevées
800 000 mesures / an

CONTEXTE

MeSeine Innovation (*programme R&D du réseau 2020*) :

Trois axes de recherche

Axe 1

Mieux connaître nos rivières franciliennes

Qualité physico-chimique et diversité biologique

Micro-contamination des eaux de surface

Ecotoxicité et toxicité des eaux de surface



Axe 2

Regarder autrement les eaux de surface

Innover dans le suivi de la qualité physico-chimique et de la diversité biologique

Innover dans le suivi de la micro-contamination et de ses effets sur le vivant

Axe 3

Faire évoluer les outils numériques

Traitement des données et modèles prédictifs

Etudier la variation spatio-temporelle de l'écotoxicité et de la diversité microbienne des eaux de surface à l'échelle de l'Ile-de-France

OBJECTIFS

- **Acquisition d'un référentiel de bioessais « de la cellule à l'organisme »** qui devra permettre d'étudier l'influence du gradient de la pression (amont-aval de la région parisienne), en tenant compte de la variabilité temporelle (période d'étiage et de crue).

- **Etude de l'écologie microbienne de la Seine**
 - Connaitre les communautés microbiennes
 - Etudier les variations spatio-temporelles de ces communautés

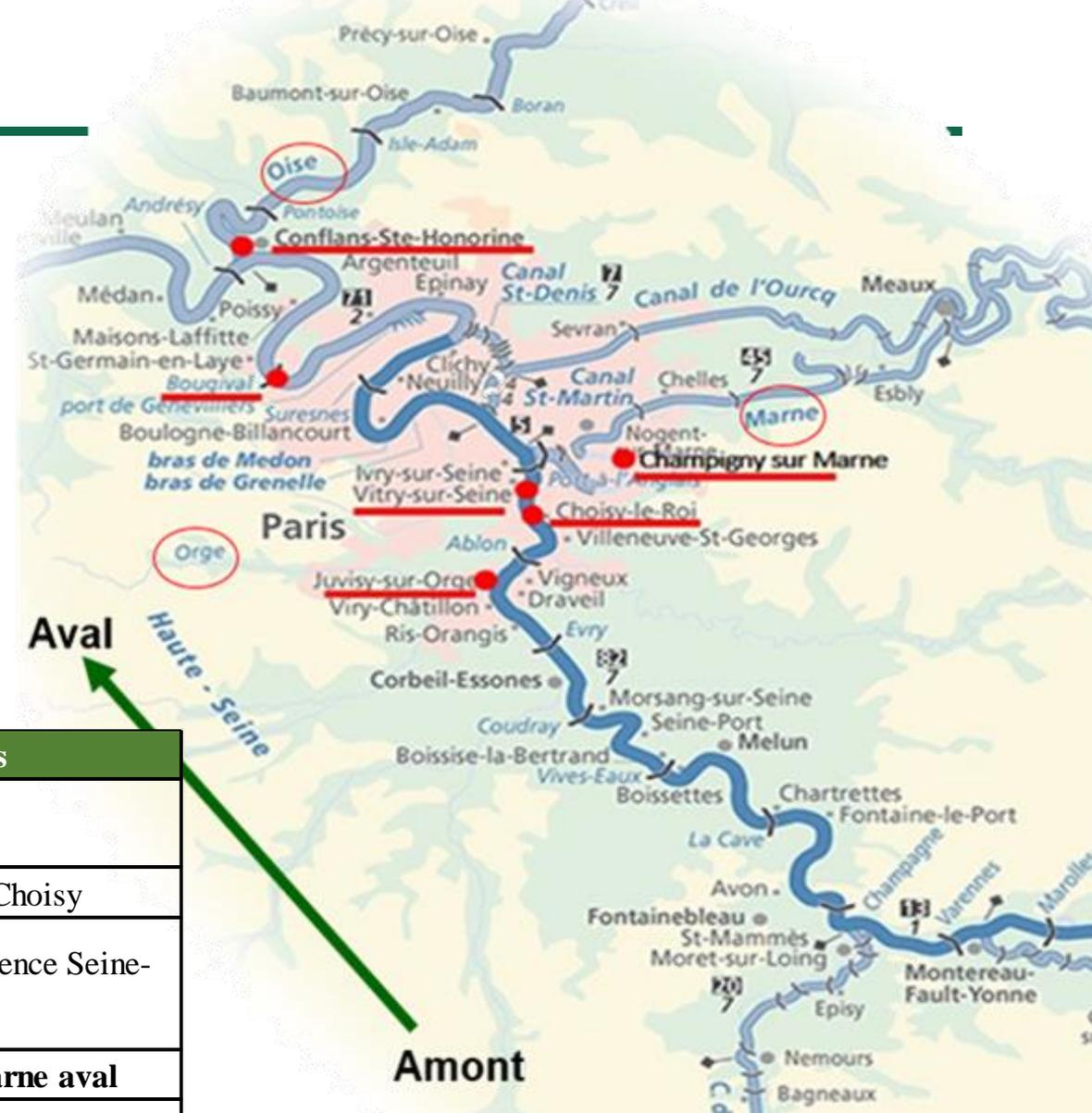
MÉTHODOLOGIE

STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

ZONE D'ECHANTILLONNAGE

- **Apport des affluents**
Marne, Orge, Oise
- **Zone d'influence du système d'assainissement du SIAAP**
- **Echantillonnage en fonction des variations saisonnières**

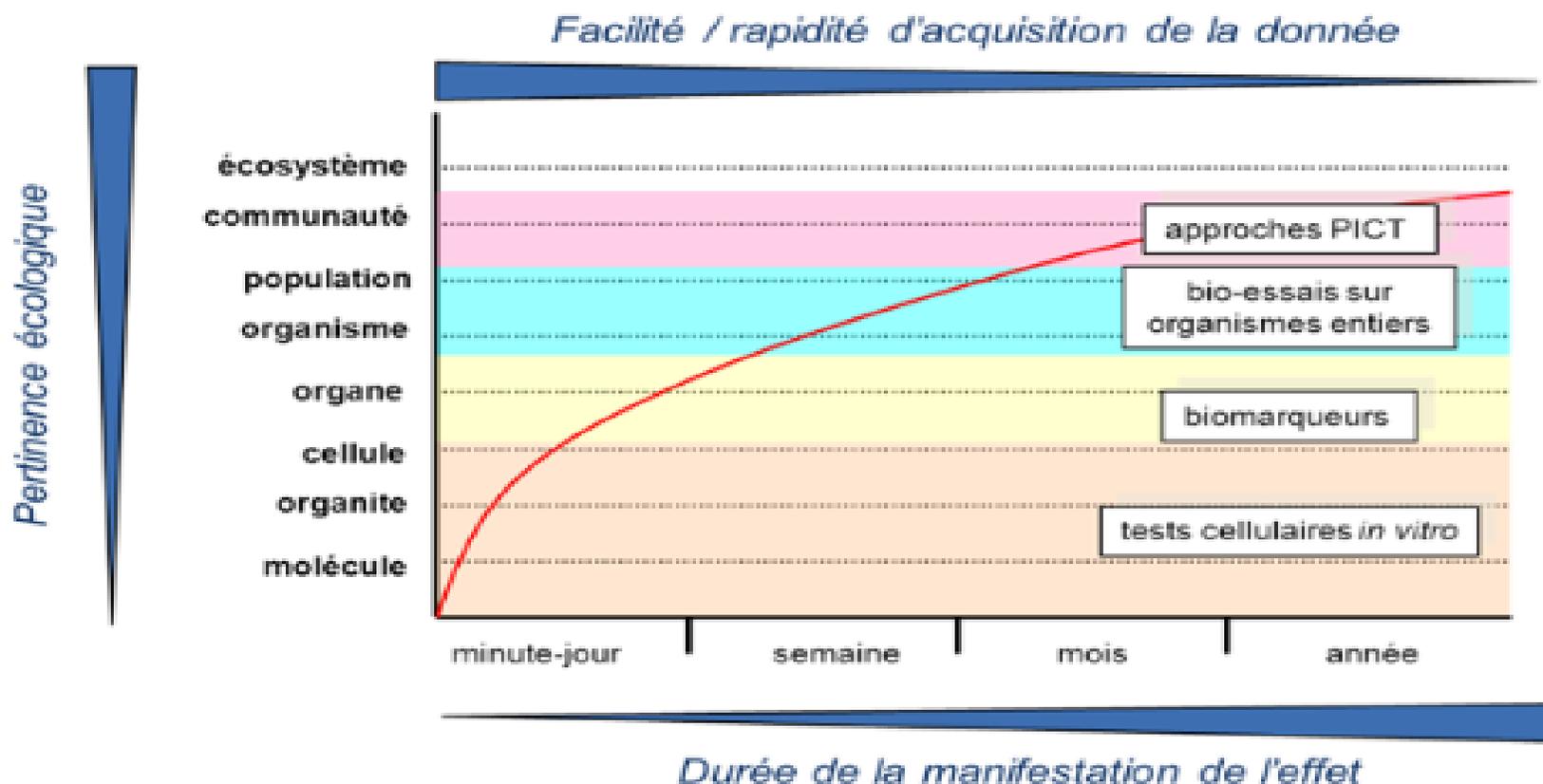
| Site | Rivière | Observations |
|--------------------------|---------|------------------------------|
| Juvisy-sur-Orge | Seine | Amont Orge |
| Choisy-le- Roi | Seine | DO Fresnes-Choisy |
| Vitry-sur-Seine | Seine | Amont confluence Seine-Marne |
| Champigny-sur-Marne | Marne | Amont de Marne aval |
| Bougival | Seine | Aval de Paris |
| Conflans-Sainte-Honorine | Oise | Amont confluence Seine-Oise |
| Triel-sur-Seine | Seine | Amont Seine Aval |



PARAMÈTRES DE SUIVI ET D'ÉVALUATION : ECOTOXICOLOGIE

BIOESSAIS

Principe : *exposer un organisme cible à un échantillon avec plusieurs gammes de concentration, dans des conditions expérimentales bien définies, proches des conditions naturelles de l'organisme. Il permet ainsi de déterminer une concentration toxique pour l'organisme, donc d'évaluer la toxicité potentielle d'une substance, un échantillon* (Thybaud and Petit 1996) (Angerville 2009) (Perrodin and Donguy 2006)



PARAMÈTRES DE SUIVI ET D'ÉVALUATION : ÉCOTOXICOLOGIE

BIOESSAIS : classification SIAAP

Activité métabolique

(mortalité, synthèse cellulaire, production énergie, alimentation)

Dysfonctionnements physio-pathologiques

(Perturbation endocrinienne, activité hormonale en lien avec la reproduction, génotoxicité)

Synthèse cellulaire et prolifération

Production énergie et alimentation

Mortalité

Activité hormonale à l'échelle de cellule

Activités thyroïdiennes, oestrogéniques, androgéniques, etc.

Perturbation endocrinienne à l'échelle de l'organisme

Axes thyroïdien, oestrogénique, androgénique, etc.
De la prédiction à l'observation de la perturbation

Atteinte au génome

Dégâts à l'ADN

Toxicité organe-spécifique (neurotoxicité, etc.)

A l'échelle de la **cellule** ou de l'**organisme**

Algues, levures, bactéries, champignon, cellules humaines, etc.

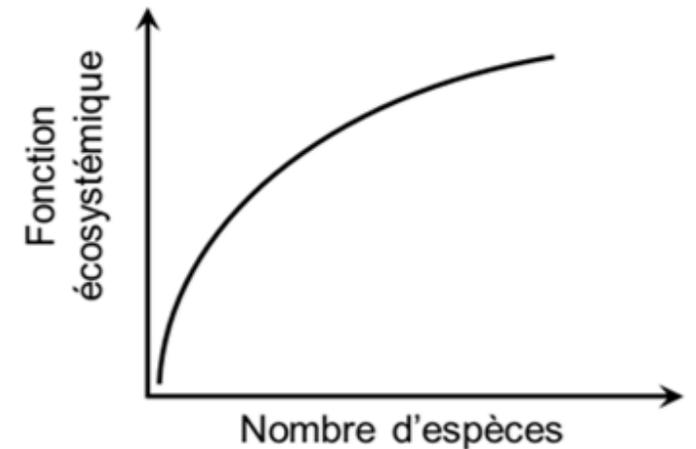
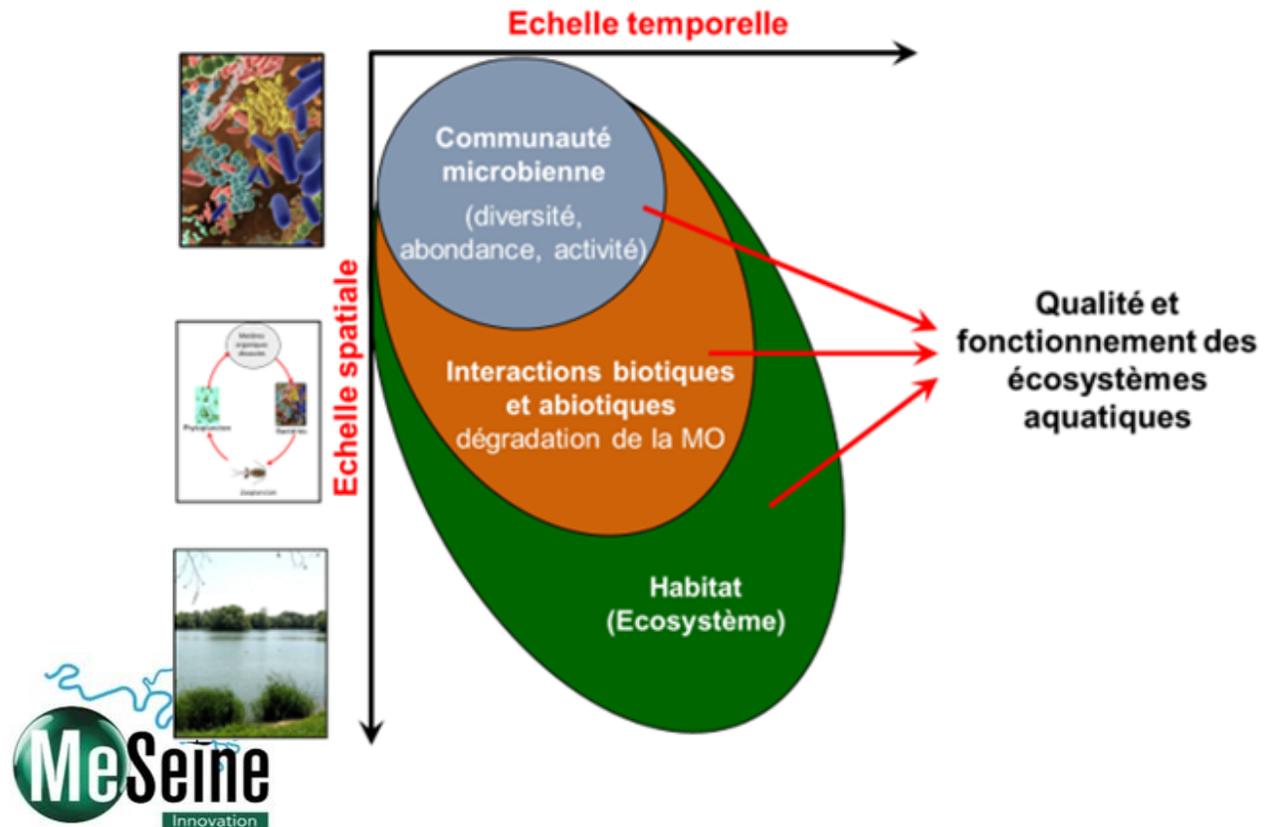
Amphibien, poisson, crustacées, etc.

PARAMÈTRES DE SUIVI ET D'ÉVALUATION : COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

ETUDE COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

Définition

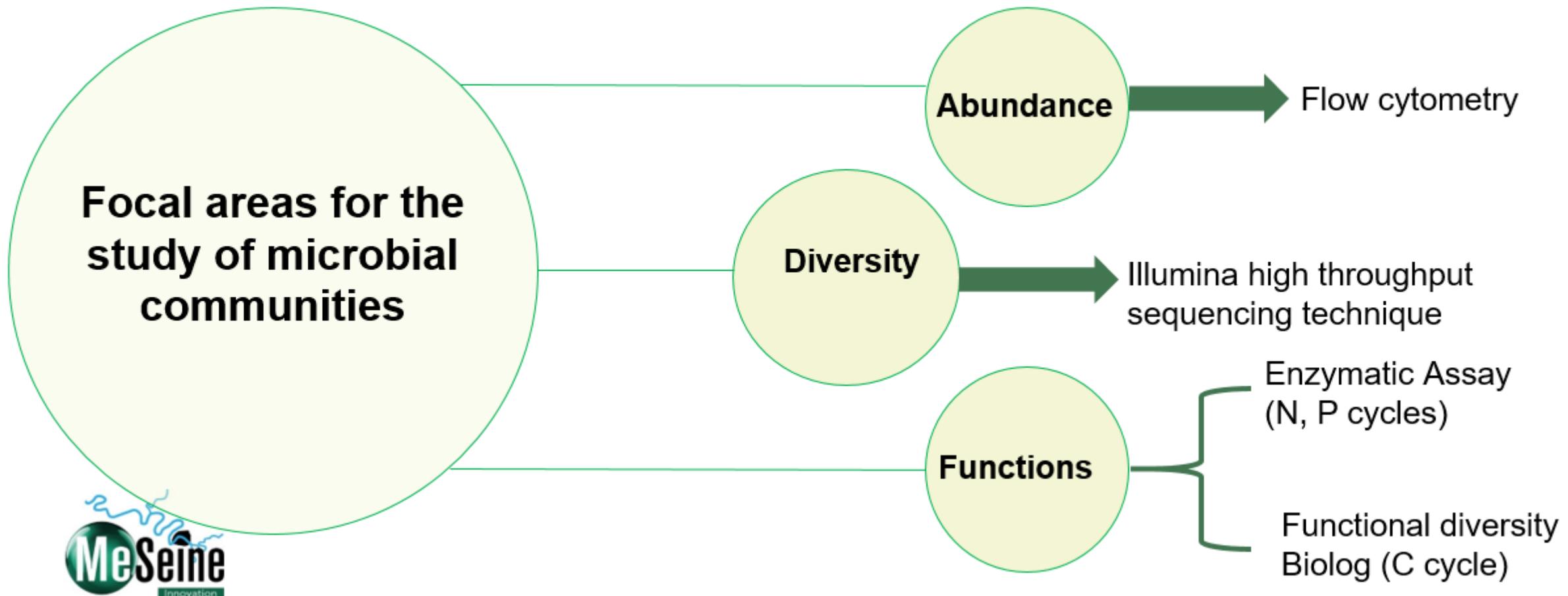
« La diversité microbienne peut donc être définie comme la variabilité des microorganismes vivant dans un écosystème du point de vu du nombre des espèces, des gènes et des traits fonctionnels présents »



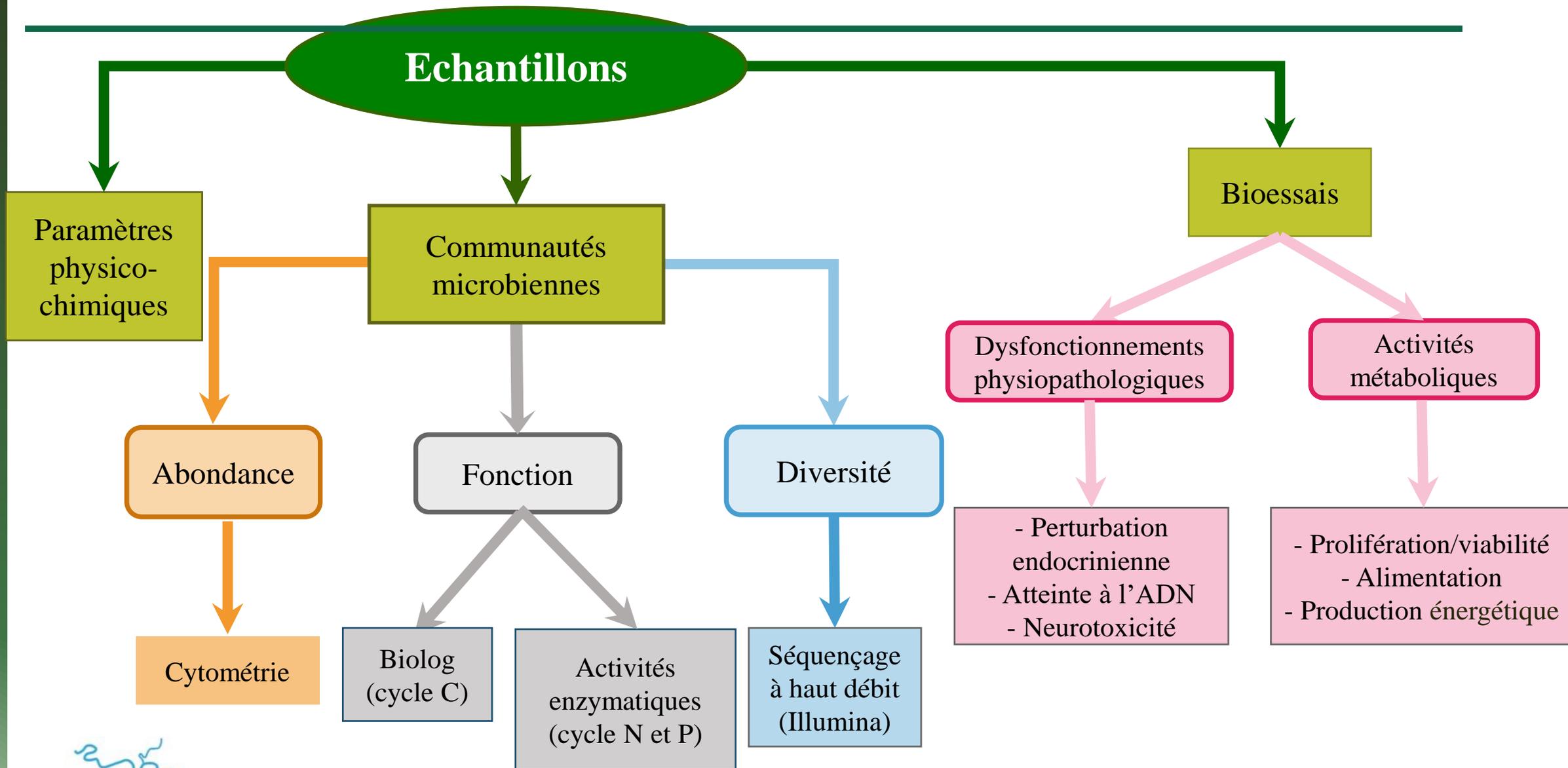
D'après Hooper et al. (2005)

PARAMÈTRES DE SUIVI ET D'ÉVALUATION : COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

ETUDE COMMUNAUTÉS MICROBIENNES



PARAMÈTRES DE SUIVI ET D'ÉVALUATION



**Merci pour votre
attention**



CLASSIFICATION DES BIOESSAIS

Selon les dysfonctionnements physiopathologiques

| Echelle | Modèle | Genre | Nom du test | Toxicité | Spécificité | Mode | Effets mesuré | Durée | Type de mesure | Observations | |
|----------------------------|-----------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---|---|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| A l'échelle de la cellule | Homme | Cellules HG5LN-TR (Plasmide) | Test TR | Perturbation endocrinienne | Perturbation thyroïdienne | in vitro | Activation du récepteur humain aux stéroïdes thyroïdiens (TR) (agoniste/antagoniste) | 18 h | Luminescence | Tame water | |
| | | cellules PALM (Prostate) | Test AR | | Perturbation androgénique | in vitro | Activation du récepteur humain aux androgènes (AR) (agoniste/antagoniste) | 18 h | Luminescence | Tame water | |
| | | cellules MELN (Sein) | Test ER | | Perturbation œstrogénique | in vitro | Activation du récepteur humain α aux oestrogènes (ER α) (agoniste/antagoniste) | 18 h | Luminescence | Tame water | |
| | Poisson | Cellules sang de <i>P.flesus</i> | Test des comètes | Génotoxicité | Atteinte à l'ADN | in vitro | Cassures simple-brin de l'ADN | 1 h | Epifluorescence | Toxem | |
| | Rat | Cellules de foie | Test des comètes | | Atteinte à l'ADN | in vivo | Cassures simple-double-brin ADN | 48h | Fluorescence | Toxem | |
| | Rat/homme | Lymphocytes | Test du micronoyau | | Atteinte à l'ADN | in vitro | Activité de substances d'essai clastogènes et aneugènes dans les cellules | 48-72h | Mesure biométrique | Toxem | |
| | Homme | Cellules ACHn (rénales) | Test H2AX | | Atteinte à l'ADN | in vitro | Phosphorylation de l'histone H2AX | 72 h | Fluorescence | Tame water | |
| | | Cellules LS174T (intestinales) | Test H2AX | | Atteinte à l'ADN | in vitro | Phosphorylation de l'histone H2AX | 72 h | Fluorescence | Tame water | |
| A l'échelle de l'organisme | Levures | <i>Saccharomyces Cerevisia</i> | Test YAS | Perturbation endocrinienne | Perturbation androgénique | in vitro | Activité Androgénique de l'échantillon | 4-8 jours | Densité optique | Kit Xenometrix | |
| | | | Test YES | | Perturbation œstrogénique | in vitro | Activité oestrogénique de l'échantillon | 4-8 jours | Densité optique | Kit Xenometrix | |
| | Crustacés | Gamares femelles | Perturbation endocrinienne | | Perturbation endocrinienne | in situ | Synchronisation du cycle de mue et de la croissance ovocytaire | 14-21 jours | Mesure biométrique | Biomae | |
| | Amphibien | Laves de Xenope | Test XETA | | Perturbation thyroïdienne | in vivo | Intensité du signal fluorescent (cerveau) | 48- 72 h | Biomarqueur fluorescent | Watchfrog | |
| | Poisson | Alevins de Médaka | Test Radar | | Perturbation androgénique | in vivo | Intensité du signal fluorescent(rein) | 72-96 h | Biomarqueur fluorescent | Watchfrog | |
| | | Alevins de Médaka | Test Radar | | Perturbation œstrogénique | in vivo | Intensité du signal fluorescent (foie) | 24 h | Biomarqueur fluorescent | Watchfrog | |
| | Bacterie | <i>Salmonella typhimurium</i> | Test d'Ames | | Génotoxicité | mutation génétique | | | 48H | | |
| | | <i>Escherichia coli</i> | Sos Chromotest | | | Altération de l'ADN | in vitro | Activité enzymatique β -galactosidase | 3 h | Mesure biochimique | Biomae |
| | Crustacés | Gammares mâles | Test Neurotoxicité | | Toxicité organo-spécifique | Neurotoxicité | in situ | Activité enzymatique AChE (exprimé en % inhibition) | 7 jours | Dosage biochimique | Biomae |
| | | Gammares mâles | LIVE/DEAD sperm viability kit | | | Spermatogenèse | in situ | Quantification des spermatozoïdes | 7-15 jours | Méthode de numération | validé par IRSTEA |
| Gammares femelles | | Mue et reproduction | Reproduction (fécondité) | | | Stade de mue et fécondité | 14-21 jours | Mesure biométrique | Biomae | | |

CLASSIFICATION DES BIOESSAIS

Selon les activités métaboliques

| Echelle | Modèle | Genre | Nom du test | Spécificité | Mode | Durée | Effets mesuré | Type de mesure | Observations |
|----------------------------|------------------------|--|---|--------------------------|-----------|-------------------------------|--|-----------------------------------|---|
| A l'échelle de la cellule | Truite (poisson) | lignée cellulaire RTG-2 de gonades | Test cytotoxicité | Vertébrés | in vitro | 24 h | Viabilité cellulaire | Fluorescence | Toxem |
| | Homme | Cellules humaine PBMC | Cellules humaines | Vertébrés | in vitro | 24 h | Production énergétique (Atp) | Luminescence | Tame water |
| A l'échelle de l'organisme | Bacterie | <i>Escherichia coli</i> | Bacterie | Décomposeurs procaryotes | in vitro | 7 h | Prolifération/ Viabilité | Absorbance | Tame water |
| | Algue | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | Algue | Producteurs eucaryotes | in vitro | 48 h | Prolifération/ Viabilité | Absorbance | Tame water |
| | Champignon | <i>Septoria tritici</i> | Champignon | Décomposeurs eucaryotes | in vitro | 7 j | Prolifération/ Viabilité | Absorbance | Tame water |
| | Levure | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Levure | Décomposeurs eucaryotes | in vitro | 24 h | Prolifération/ Viabilité | Absorbance | Tame water |
| | Crustacés | Gammarès mâles | Alimentation | Invertébrés | in situ | 7 jours | Taux d'alimentation | Mesure biometrique | Biomae |
| | | Gammarès mâles | Survie | Invertébrés | in vivo | 7 jours | survie (Taux de mortalité) | Numération | Biomae |
| | | Gammarès femelles | Survie | Invertébrés | in vivo | 21 jours | survie (Taux de mortalité) | Numération | Biomae |
| | Algue | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | Algue | Producteurs eucaryotes | in vitro | 48 h | Production énergétique (Photosystème) | Absorbance | Tame water |
| | Crustacés | <i>Daphnia magna Strauss</i> | Survie Reproduction | Invertébrés | in vitro | 21 jours | Reproduction | numération des daphnies jeunes | Essai normalisé NF ISO/FDIS 10706, 1999 /OCDE 211 |
| | Crustacés | <i>Daphnia magna Strauss</i> | Inhibition de la mobilité | Invertébrés | in vitro | 24-48 h | Inhibition de la mobilité | Mobilité | Essai normalisé Norme NF ISO 6341 1996 |
| | Crustacé | <i>Ceriodaphnia Dubia</i> | Inhibition de croissance de population et reproduction | cosommateur | in vitro | 7 jours | croissance de population et reproduction | Numeration | NF ISO 20665 : 2008 |
| | Bacterie | <i>Pseudomonas putida</i> | Inhibition de la croissance de Pseudomonas putida | Décomposeur | | 72 h | croissance de la population | | Essai normalisé Norme NF ISO 10712 1996 |
| | Algue | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | Inhibition de la croissance de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | Producteurs | | 72 h | croissance de la population | Numeration | NF EN ISO 8692 OCDE 201 |
| Bacterie | <i>Vibrio fischeri</i> | Essai bactéries luminescentes | Producteurs eucaryotes | in vitro | 15-30 min | Inhibition de la luminescence | Luminescence | Essai normalisé NF EN ISO 11348-3 | |

TECHNIQUES DE MESURE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

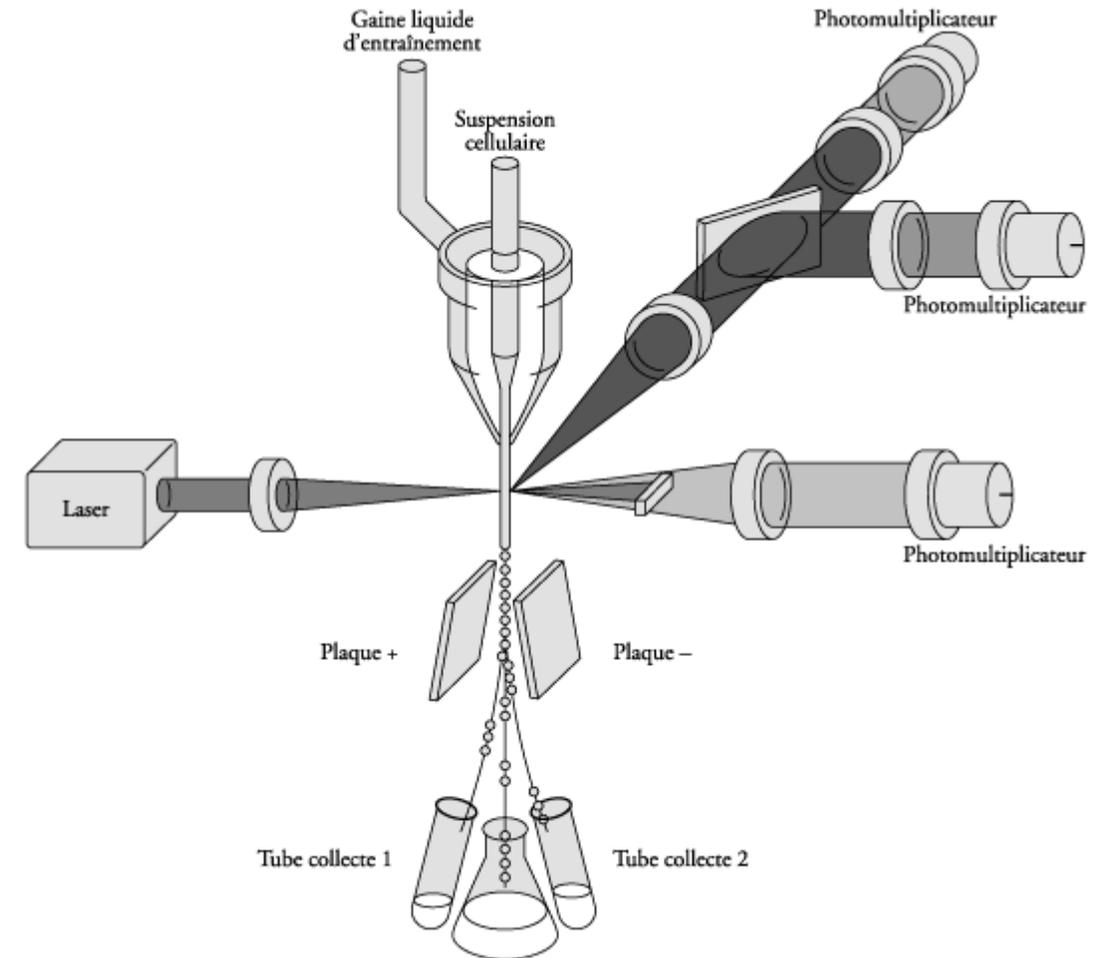
Abondance

Principe cytométrie en flux

Les particules contenues dans l'échantillon sont séparées et alignées par un système de focalisation hydrodynamique grâce au liquide de gaine.

Les cellules vont passer devant le laser. Elles diffusent alors les photons de ce dernier, sous des signaux lumineux dont l'intensité est variable.

(Guiselin 2010) (Helmi 2016) (Cellamare 2005)



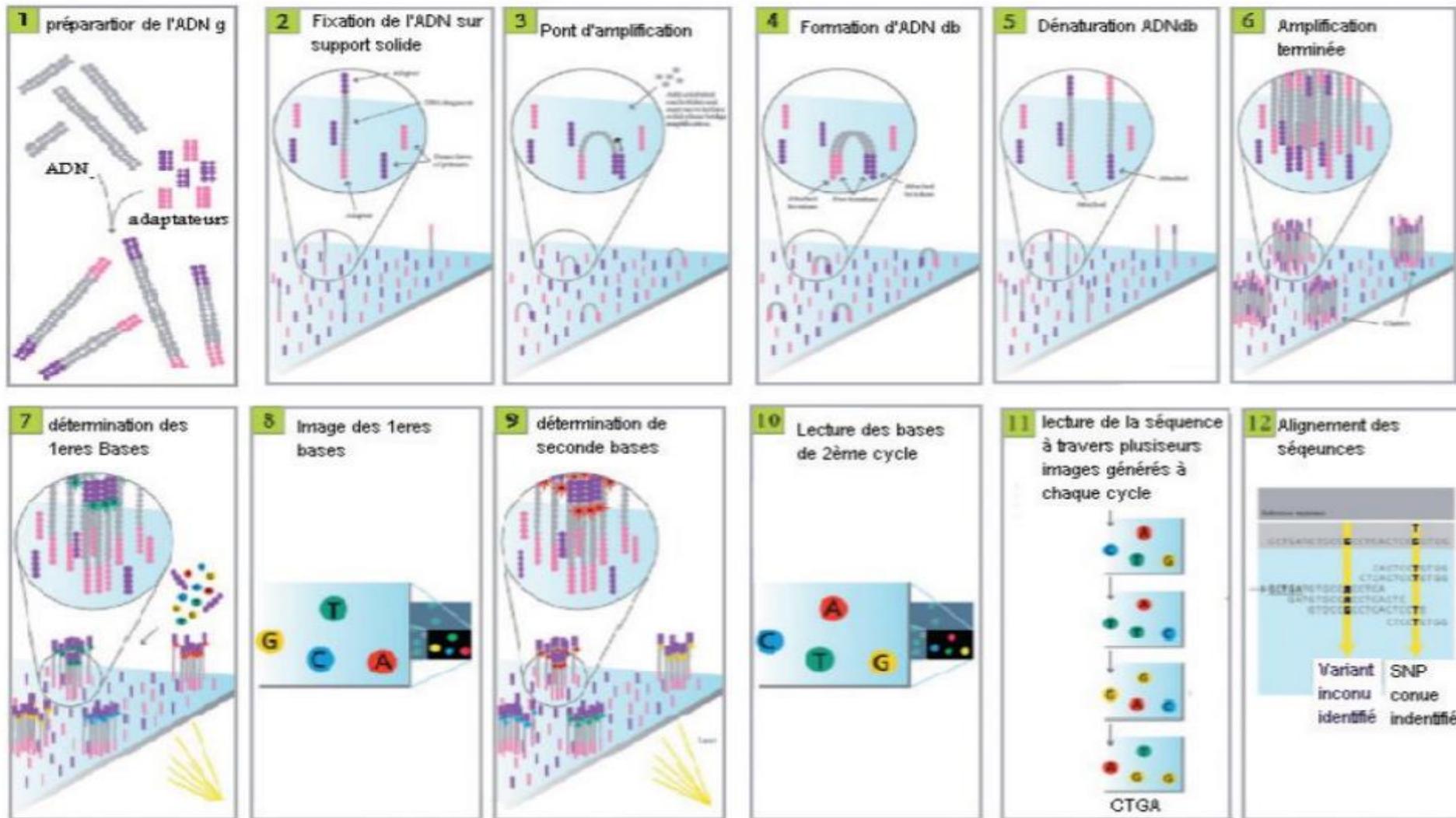
Cytomètre en flux

(Philippe Métézeau, Philippe Vielh 2001)

TECHNIQUES DE MESURE DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

Sequencage à haut débit ILLumina

- **Extraction d'ADN**
- **Amplification de l'ADN par PCR**
- **Séquençage à haut débit : illumina**
- **Traitement bio-informatique des données**
- **Traitement biostatistique**



Pour le séquençage, 4 nucléotides (A, C, G, T) présentant des caractéristiques spécifiques, vont être incorporés au milieu. L'extrémité 3'OH de ces nucléotides est désactivée, et marquée par des fluorochromes spécifiques à chaque nucléotide. Chaque nucléotide aura une couleur spécifique à elle. Une ADN polymérase va insérer ces nucléotides au brin complémentaire des amplicons. Après excitation par un laser, la fluorescence émise par chaque cluster est récupérée et la première base est lue. Et ainsi de suite, l'opération sera effectuée pour tous les clusters présents sur la plaque séquence (Ona-Nguema et al. 2015) (RAOUS 2013).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Álvarez, Eva, Ángel López-Urrutia, Enrique Nogueira, and Santiago Fraga
2011 How to Effectively Sample the Plankton Size Spectrum? A Case Study Using FlowCAM. *Journal of Plankton Research* 33(7): 1119–1133.
- Amblard, C., J. C. Boisson, G. Bourdier, et al.
2005 Écologie Microbienne En Milieu Aquatique : Des Virus Aux Protozoaires. *Revue Des Sciences de l'eau* 11: 145–162.
- Broutin, Mathias, Guillaume Caffier, Farida Madi, and Luis Felipe Artigas
2011 Synthèse bibliographique sur les techniques de suivi de l'abondance, biomasse et diversité du phytoplancton en eaux marines: 30.
- Corre, Erwan
2000 Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes: les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers. Thèse Université de Bretagne Occidentale: 187.
- Dworkin, Martin, and David Gutnick
2012 Sergei Winogradsky: A Founder of Modern Microbiology and the First Microbial Ecologist. *FEMS Microbiology Reviews* 36(2): 364–379.
- Glick, Bernard R.
2003 Phytoremediation: Synergistic Use of Plants and Bacteria to Clean up the Environment. *Biotechnology Advances* 21(5): 383–393.
- Got, P., B. Baleux, and M. Troussellier
2005 Dénombrements directs des bactéries des milieux aquatiques par microscopie en épifluorescence : comparaison entre un système d'analyse d'images automatisé (Mudicam®) et l'observation visuelle. *Revue des sciences de l'eau* 6(3): 269–284.
- Grall, Jacques, and N. Coic
2006 Synthèse Des Méthodes d'évaluation de La Qualité Du Benthos En Milieu Côtier.
- Guiselin, Natacha
2010 Etude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques par microscopie et cytométrie en flux, en eaux côtières de la Manche orientale. Thèse Université du littoral CÔTE D'OPALE: 237.
- Hara, Shigemitsu, Kazuki Terauchi, and Isao Koike
1991 Abundance of Viruses in Marine Waters: Assessment by Epifluorescence and Transmission Electron Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 57(9): 2731–2734.
- Helmi, Karim
2016 Application de la cytométrie en flux pour le contrôle microbiologique de l'efficacité de traitements de l'eau. Thèse Université de Cergy-Pontoise: 161.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Angerville R. (2009) : Evaluation des risques écotoxicologiques liés au déversement de Rejets Urbains par Temps de Pluie (RUTP) dans les cours d'eau :Application à une ville française et à une ville haïtienne thèse]. INSA, Lyon. 485 p

BOILLOT C. (2008) : Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l'amélioration de la phase « caractérisation des effets » [thèse]. INSA, Lyon. 298 p

Erwan C (2000) : Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes: les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers [thèse]. 187.

DU PASQUIER D., LEMKINE G., MEYNEROL K., SAUVIGNET P., BORSATO J., GONCALVES A., ROCHER V. (2015) « Intérêt de la mesure biologique dans le suivi des performances de traitement des polluants « émergents » en eaux résiduaires municipales ». Techniques Sciences Méthodes; 10:, 33-42.

Moilleron R., Morin C., Paulic L., Marconi A., Rocher V., Mailler R., Bressy A., Garrigue-Antar L. (2019) « CARACTERISATION DU POTENTIEL TOXIQUE DES EAUX URBAINES PAR BIOESSAIS - CAS DE L'AGGLOMERATION PARISIENNE »

REBILLARD JP, PAULIC L, AEAG, VIGICELL SANTE & ENVIRONNEMENT(2014) EVALUATION DE LA QUALITE DE L'EAU DE 15 STATIONS DU BASSIN ADOUR-GARONNE PAR UN PANEL DE BIO-ESSAIS

Servais, P., Billen, G. Goncalvez, A. & Garcia-Armisen, T. 2007b. Modelling microbiological water quality in the Seine river drainage network: past, present and future situations. Hydrology and Earth System Sciences. 11 : 1581-1592.

George, Isabelle, Adriana Anzil, Raphaël Lanckman, et al.
2012 Axe 4 Bloc 2A: Communautés microbiennes dans les rivières du bassin de la Seine: diversité et lien avec la présence de polluants chimiques: 10.

