

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

**Sadia BAGAGNAN**

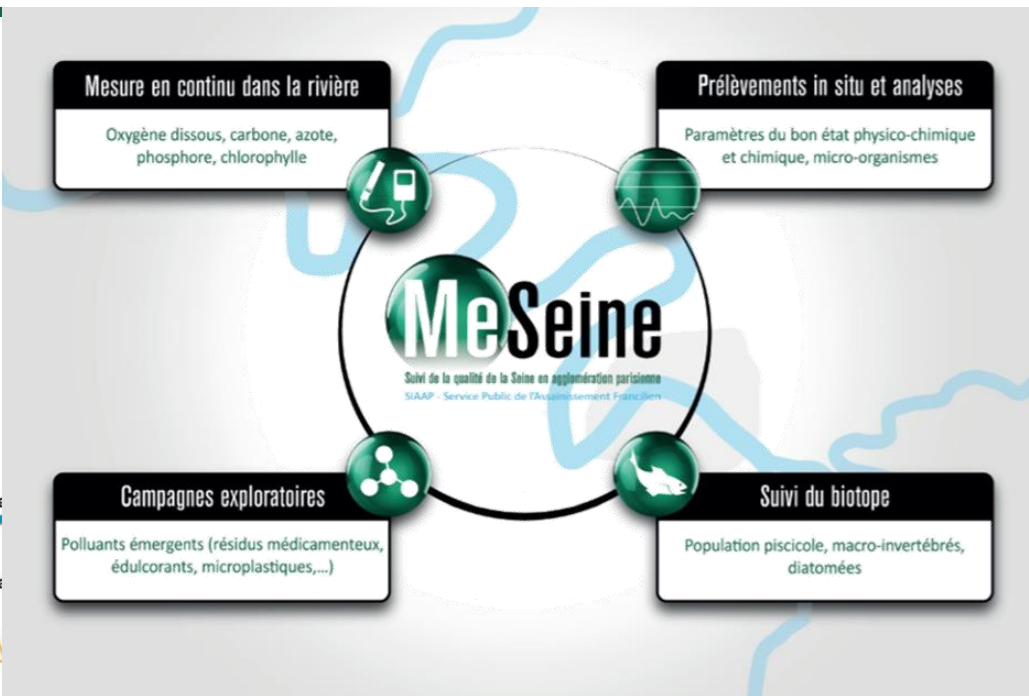
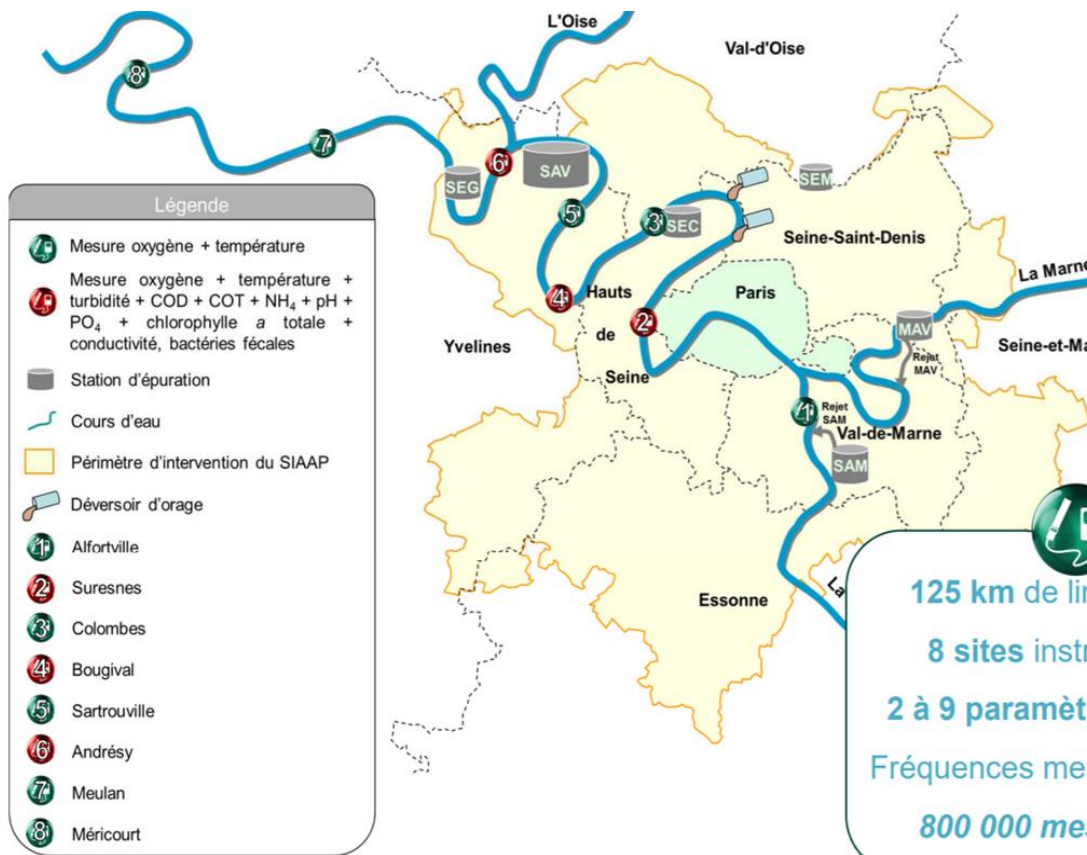
Encadrée par :  
Régis MOILLERON  
My Dung JUSSELME  
Sabrina GUERIN

# 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

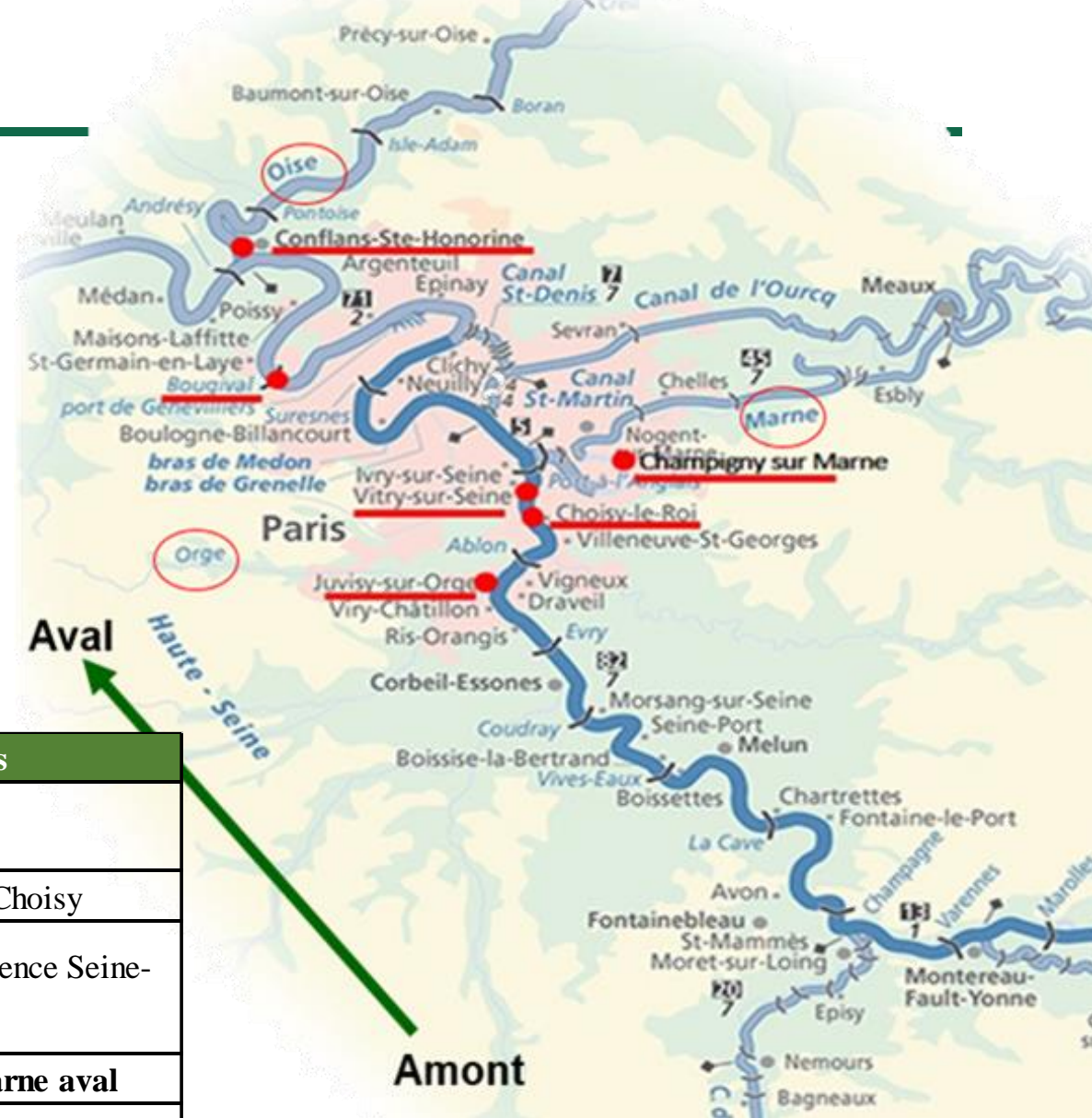
# MÉTHODOLOGIE

# 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**

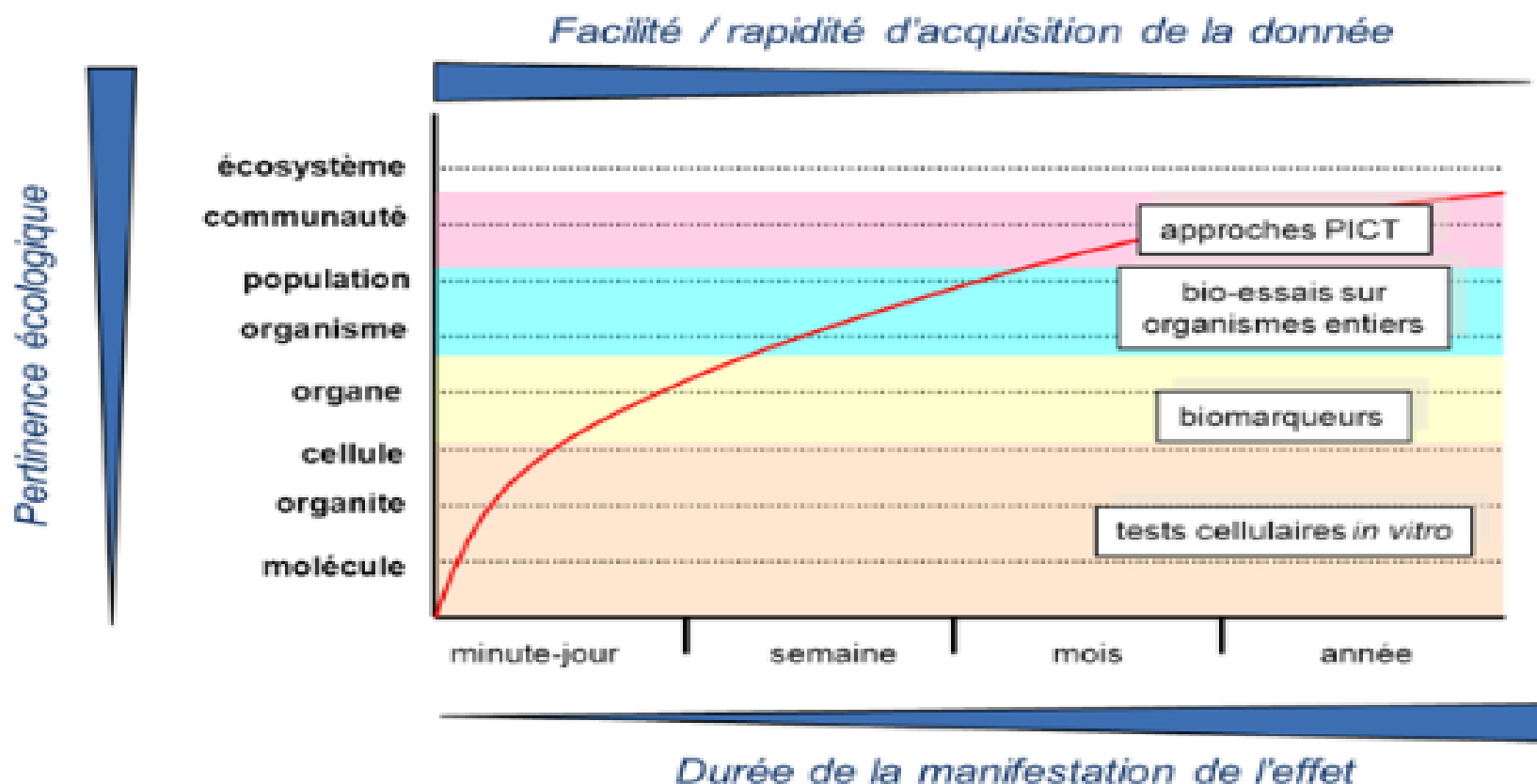
Site	Rivière	Observations
Juvisy-sur-Orge	Seine	Amont Orge
Choisy-le- Roi	Seine	DO Fresnes-Choisy
Vitry-sur-Seine	Seine	Amont confluence Seine-Marne
Champigny-sur-Marne	Marne	Amont de <b>Marne aval</b>
Bougival	Seine	Aval de Paris
Conflans-Sainte-Honorine	Oise	Amont confluence Seine-Oise
Triel-sur-Seine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



# 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.

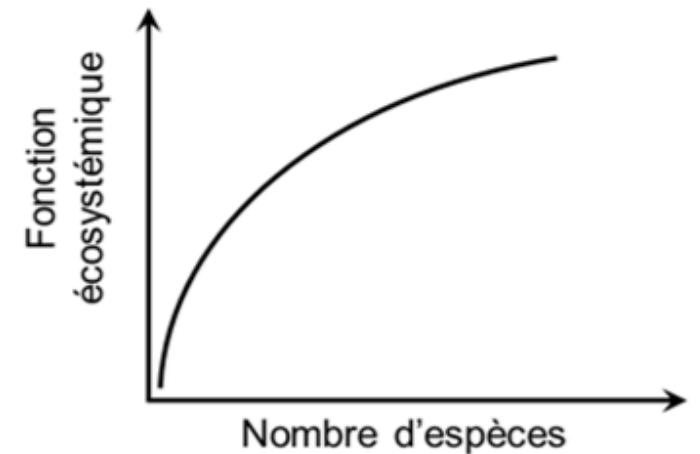
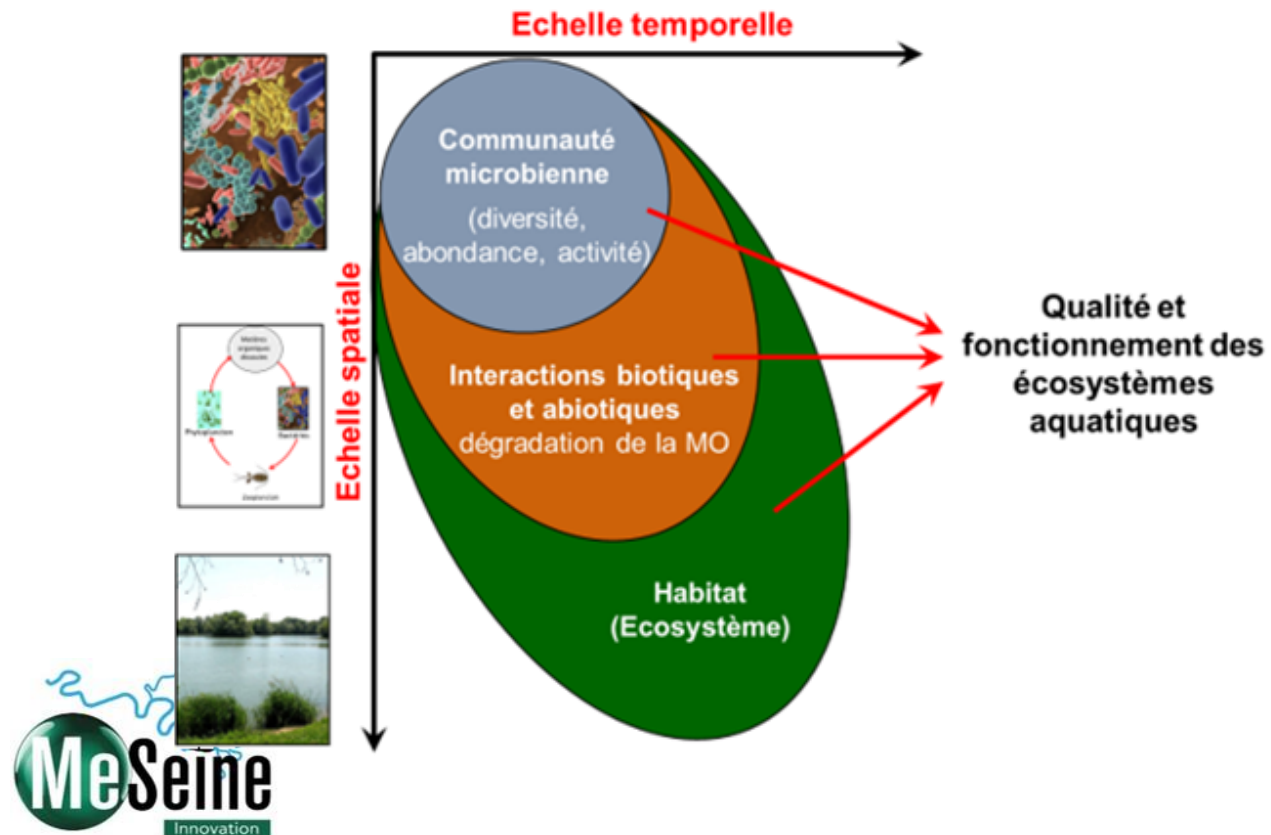
Amphibien, poisson, crustacées, etc.

# PARAMÈTRES DE SUIVI ET D'ÉVALUATION : COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

## ETUDE COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

### Définition

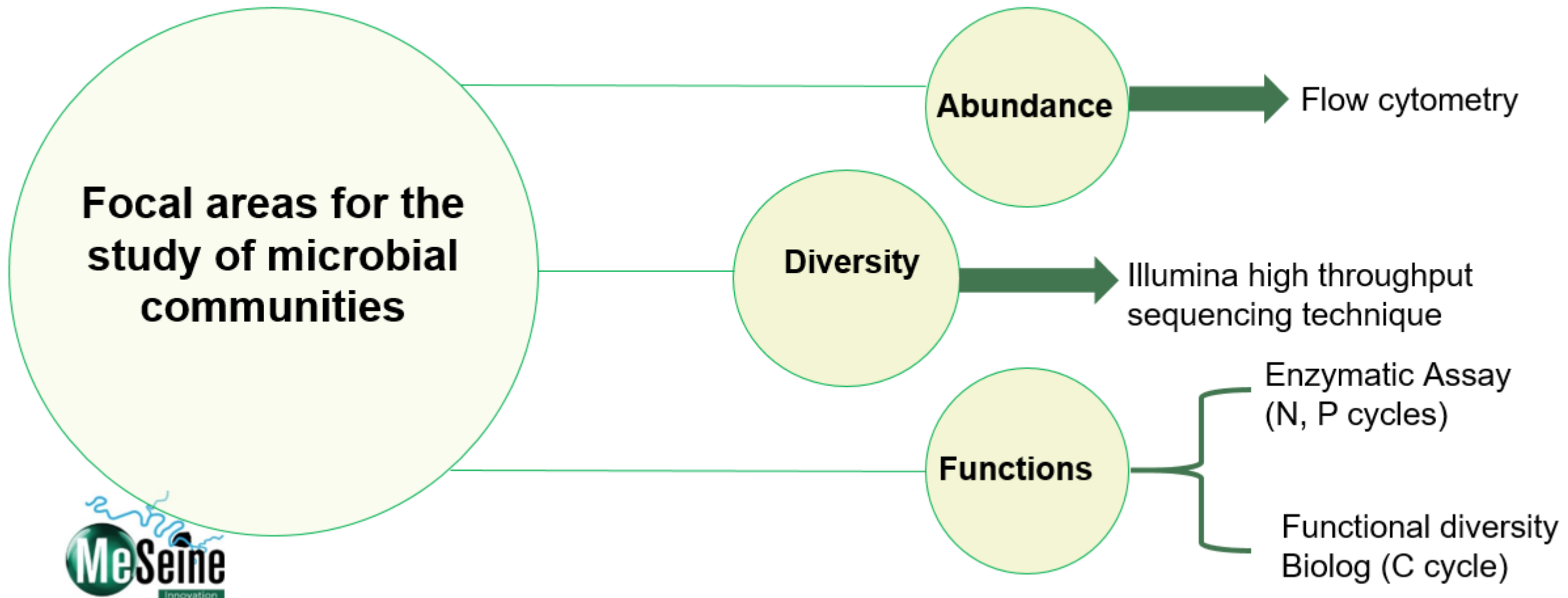
« La diversité microbienne peut donc être définie comme la variabilité des microorganismes vivant dans un écosystème du point de vu du nombre des espèces, des gènes et des traits fonctionnels présents »



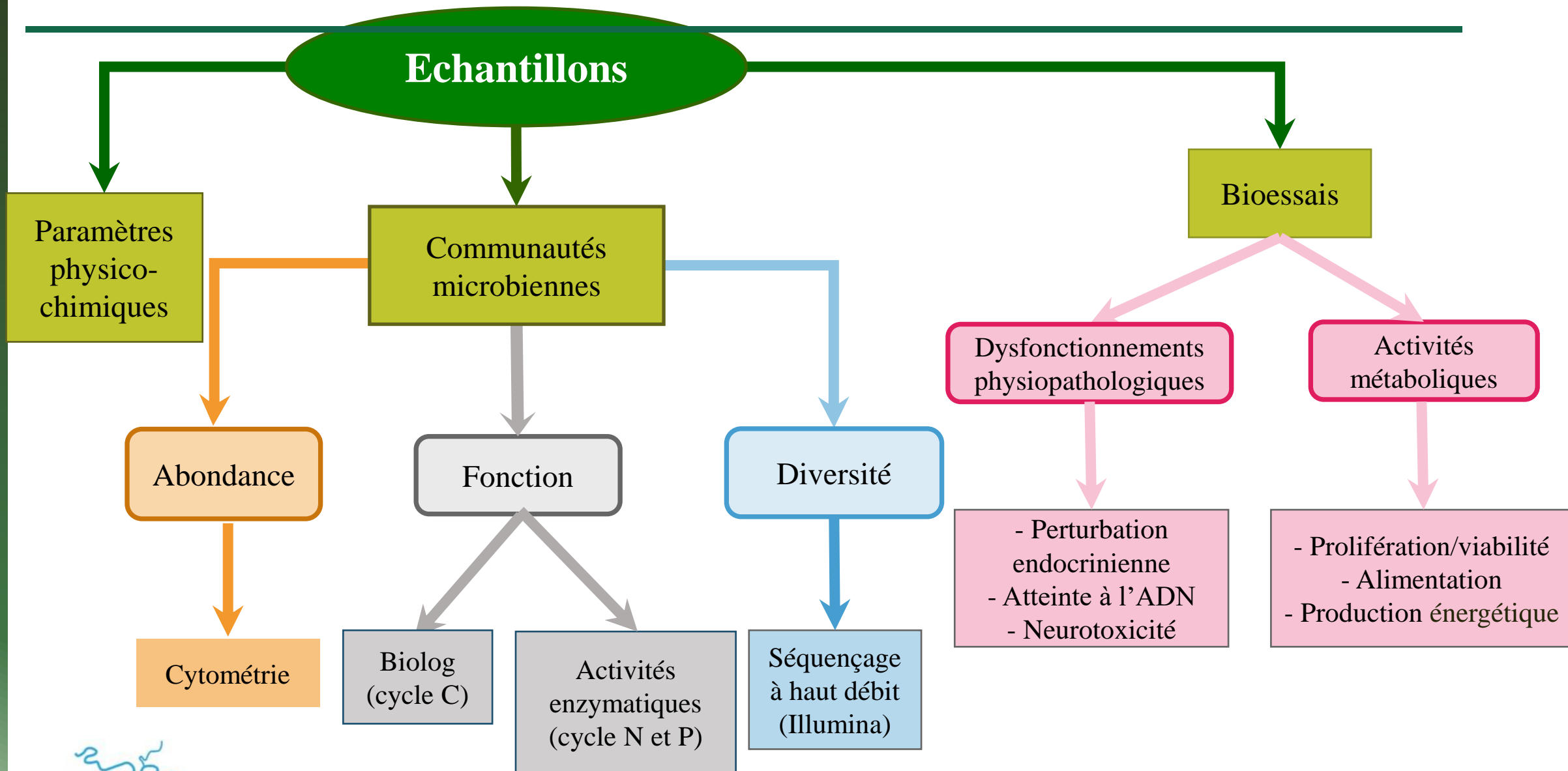
D'après Hooper et al. (2005)

# 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 $\alpha$ aux oestrogènes (ER $\alpha$ ) (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 $\beta$ -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

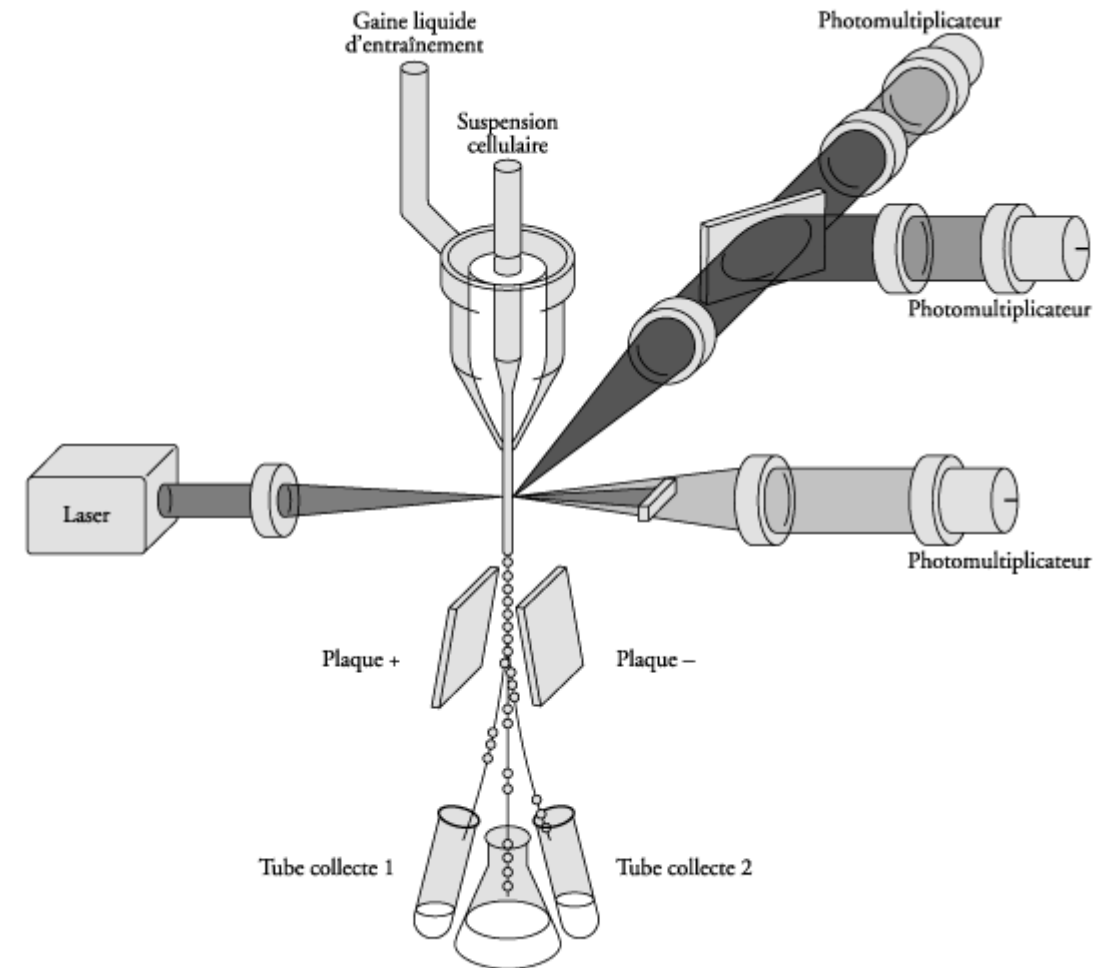
## Abondance

### 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

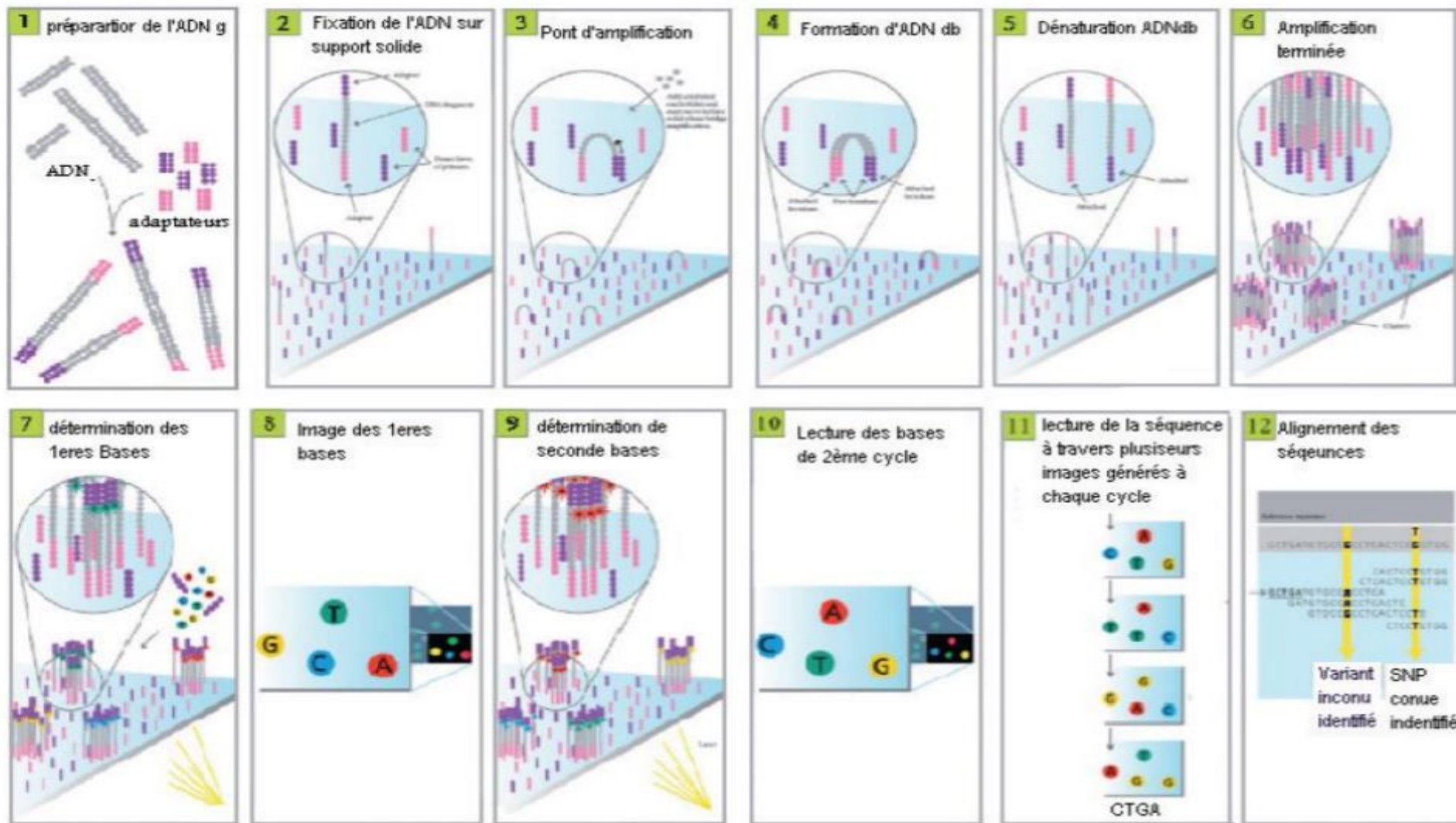
(Philippe Métézeau, Philippe Vielh 2001)



# 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.

