



OCTOBRE  
2017

# LA MICROBIOLOGIE MOLÉCULAIRE

## AU SERVICE DU DIAGNOSTIC ENVIRONNEMENTAL

Ouvrage coordonné par  
L. Ranjard, P-A. Maron,  
P. Cuny et E. d'Oiron Verame



ADEME



Agence de l'Environnement  
et de la Maîtrise de l'Energie

## **Ce document est édité par l'ADEME**

### **ADEME**

20, avenue du Grésillé  
BP 90406 | 49004 Angers Cedex 01

### **Coordination technique ADEME :**

Isabelle Déportes, Direction économie circulaire et  
consommation durable, service mobilisation  
et valorisation des déchets

Antonio Bispo, Direction productions et énergies durables,  
service forêt, alimentation et bioéconomie

Cécile Grand, Direction villes et territoires durables, service  
friches urbaines et sites pollués

### **Suivi d'édition ADEME :**

Sylvie Guyader, Service communication et formation des  
professionnels

### **Création graphique et réalisation :**

A4 éditions 02 41 720 700 et TERBEL 09 60 16 71 33

### **Secrétariat de rédaction :**

Mickaël Legrand 05 24 35 40 73

### **Crédit photos de la couverture :**

INRA (4), Max Lerouge/LMCU, Guillaume Landry/ADEME,  
Cécile Grand/ADEME, Fotolia.

**Impression :** Imprimé en France - Setig-Abelia  
certification PEFC, Imprim'vert. 250 ex

### **Brochure réf. 8888**

**ISBN imprimé :** 979-10-297-0485-7

**ISBN numérique :** 979-10-297-0486-4

**Dépôt légal :** © ADEME Éditions, octobre 2017

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite selon le Code de la propriété intellectuelle (Art L 122-4) et constitue une contrefaçon réprimée par le Code pénal. Seules sont autorisées (Art L 122-5) les copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, ainsi que les analyses et courtes citations justifiées par le caractère critique, pédagogique ou d'information de l'œuvre à laquelle elles sont incorporées, sous réserve, toutefois, du respect des dispositions des articles L 122-10 à L 122-12 du même Code, relatives à la reproduction par reprographie.

Any representation or reproduction of the contents herein, in whole or in part, without the consent of the author(s) or their assignees or successors, is illicit under the French Intellectual Property Code (article L 122-4) and constitutes an infringement of copyright subject to penal sanctions. Authorised copying (article 122-5) is restricted to copies or reproductions for private use by the copier alone, excluding collective or group use, and to short citations and analyses integrated into works of a critical, pedagogical or informational nature, subject to compliance with the stipulations of articles L 122-10 - L 122-12 incl. of the Intellectual Property Code as regards reproduction by reprographic means.



## **Les techniques « omiques » décryptent le monde vivant et servent l'environnement.**

Il y a encore quelques dizaines d'années, l'étude du vivant reposait sur l'observation macroscopique des organismes terrestres et aquatiques. L'étude du génome et la possibilité de le décoder ont fait émerger la génomique, la transcriptomique et la protéomique. Ces nouvelles technologies dites « omiques » sont déjà utilisées et répandues dans les domaines de la santé et de la médecine légale, ainsi que des recherches en parentalité. Elles émergent aujourd'hui dans le domaine de l'environnement.

Dans ses missions de protection des sols, de réhabilitation des sols pollués et de traitement des déchets organiques l'ADEME a en effet soutenu de nombreuses études mettant en œuvre ces outils novateurs dans des contextes variés : diagnostic microbiologique des eaux, des sols, de l'air et des déchets. Tout en restant complémentaires aux caractérisations physico-chimiques, ils peuvent faciliter le contrôle et le suivi d'une perturbation et/ou une réhabilitation ou encore évaluer les traitements biologiques des déchets. Parce que les microorganismes jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes, ils peuvent renseigner sur le bon état écologique des matrices eau, sol et air. Consciente de l'avenir de ces outils mais aussi de leur complexité, l'ADEME propose dans cet ouvrage leur description sous forme pédagogique et avec des applications sous forme de fiches permettant de proposer des indicateurs disponibles en fonction des questions environnementales.

Pour réaliser cet ouvrage, l'ADEME et l'Observatoire français des sols vivants (OFSV) se sont entourés de plusieurs dizaines d'auteurs scientifiques et techniques coordonnés par Philippe Cuny (Université de la Méditerranée Aix Marseille 2), Pierre-Alain Maron et Lionel Ranjard (INRA Unité « agroécologie » de Dijon).

L'ADEME souhaite que les professionnels de l'eau, de l'air, des sols et des déchets trouvent dans cet ouvrage les éléments pour franchir un cap dans l'utilisation de ces outils biologiques.

**Joëlle Kergreis-Laissus,**  
*Directrice exécutive des programmes adjointe, ADEME*



## Les coordinateurs de l'ouvrage



### **Coordinateurs scientifiques :**

#### **Lionel Ranjard,**

Directeur de recherches, INRA Dijon - UMR Agroécologie. Spécialiste en écologie microbienne du sol, il anime des travaux sur la distribution spatiale des microorganismes dans le sol sur de grandes échelles spatiales et sur l'impact des pratiques agricoles sur la qualité microbiologique des sols. Il coordonne différents projets collaboratifs et participatifs dans ce domaine.



#### **Pierre-Alain Maron,**

Directeur de recherches INRA Dijon - UMR Agroécologie Dijon. Spécialiste en écologie microbienne, ses travaux portent sur le rôle de la diversité des communautés microbiennes dans le fonctionnement du sol. Au cours de sa carrière, il a contribué au développement d'outils moléculaires de caractérisation de la diversité des communautés microbiennes du sol basés sur l'analyse du métagénome et du métagénomique.



#### **Philippe Cuny,**

Professeur des universités OSU Institut Pythéas Aix-Marseille Université, Institut Méditerranéen d'Océanologie au sein de l'équipe Microbiologie Environnementale Biotechnologie.

Son travail scientifique s'inscrit dans une démarche intégrative pluridisciplinaire qui vise à comprendre la dynamique complexe des contaminants organiques dans les écosystèmes marins.

### **Coordinatrice technique**



#### **Elisabeth d'Oiron Verame,**

Secrétaire générale, Observatoire français des sols vivants (OFSV).

Cheffe de projet en organisation pendant 17 ans, avant de devenir agricultrice, Elisabeth d'Oiron a apporté son expérience à l'Observatoire français des sols vivants, pour faire travailler ensemble les utilisateurs des sols et les chercheurs, et faire naître de ce métissage des outils de diagnostic de l'impact des pratiques sur la qualité des sols, utilisable en commun par les deux communautés.

## REMERCIEMENTS

L'ADEME, l'Observatoire français des sols vivants et les coordinateurs scientifiques et technique remercient les experts scientifiques P. Amato (CNRS), T. Heulin (CNRS), B. Balloy (chambre d'Agriculture de France), S. Courtois (Suez), J.-Y. Richard (Suez), P. Bonin (CNRS), J.-M. Baudoin (Onema), A.-M. Pourcher (Irstea) et A. Henry (Veolia) pour leurs relectures et commentaires qui ont permis d'améliorer significativement la qualité de cet ouvrage.

## Les contributeurs de l'ouvrage

### **Inra (Institut national de la recherche agronomique)**

Arrouays Dominique (US Infosol, Orléans)  
Bouchez Agnès (UMR Carrtel, Thonon)  
Dequiedt Samuel (UMR Agroécologie, Dijon)  
Domaizon Isabelle (UMR Carrtel, Thonon)  
Godon Jean-Jacques (UMR LBE, Narbonne)  
Hartmann Alain (UMR Agroécologie, Dijon)  
Horrigue Walid (UMR Agroécologie, Dijon)  
Houot Sabine (UMR Ecosys, Grignon)  
Jolivet Claudy (US Infosol, Orléans)  
Le Goff Olivier (UMR LBE, Narbonne)  
Maron Pierre-Alain (UMR Agroécologie, Dijon)  
Martin-Laurent Fabrice (UMR Agroécologie, Dijon)  
Mougel Christophe (UMR IGEPP, Rennes)  
Munier Jollain Nicolas (UMR Agroécologie, Dijon)  
Ranjard Lionel (UMR Agroécologie, Dijon)  
Rimet Frédéric (UMR Carrtel, Thonon)  
Saby Nicolas (US Infosol, Orléans)  
Terrat Sébastien (UMR Agroécologie, Dijon)  
Viollet Amandine (UMR Agroécologie, Dijon)  
Wery Nathalie (UMR LBE, Narbonne)

### **Cirad (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement)**

Lienhard Pascal (Vientiane, Laos)

### **CNRS (Centre national de la recherche scientifique)**

Bonin Patricia (UM 110, Marseille)  
Debroas Didier (UMR LMGE, Clermont Aubière)  
Dufresne Alexis (UMR Écobio, Rennes)  
Nazaret Sylvie (UMR LEM, Lyon)  
Sylvi Léa (UM110, Marseille)

### **AgroSup Dijon**

Chemidlin Prévot - Bouré Nicolas (UMR Agroécologie, Dijon)  
Sadet Bourgeteau Sophie (UMR Agroécologie, Dijon)

### **Universités**

Atkinson Alexandre (Institut méditerranéen d'océanographie, Aix-Marseille Université)  
Corsellis Yannick (Institut méditerranéen d'océanographie, Aix-Marseille Université)  
Philippe Cuny (Institut méditerranéen d'océanographie, OSU Institut Pythéas, Aix-Marseille Université)  
Debroas Didier (UMR LMGE, université de Clermont-Ferrand)  
Dufresne Alexis (UMR Écobio, université de Rennes)  
Favre Bonté Sabine (UMR LEM, université Lyon I)  
Gasc Cyrielle (université de Clermont-Ferrand)  
Gaüzère Carole (CSTB, université Paris-Est)  
Lyautey Émilie (UMR Carrtel, Université de Savoie)  
Michotey Valérie (Institut méditerranéen d'océanographie, OSU Institut Pythéas, Aix-Marseille Université)  
Militon Cécile (Institut méditerranéen d'océanographie, OSU Institut Pythéas, Aix-Marseille Université)  
Moletta-Denat Marina (CSTB, université Paris-Est)  
Peyret Pierre (université de Clermont-Ferrand)  
Quaiser Achim (UMR Écobio, université de Rennes)  
Robine Enric (CSTB, université Paris-Est)

### **IRD (Institut de recherche pour le développement)**

Armougom Fabrice (IR, UM 110, Marseille)

### **Irstea Antony (Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture)**

Bernard Claire  
Bize Ariane  
Bouchez Théodore  
Bridier Arnaud  
Goubet Anne  
Juzan Lauriane  
Le Quéméner Elie Desmond  
Mazeas Laurent  
Pernelle Jean-Jacques

### **Helmholtzzentrum Munich**

Roullier-Gall Chloé  
Schmitt-Koplin Philippe

### **BRGM Orléans (Bureau de recherche géologique et minière)**

Hellal Jennifer  
Hubé Daniel  
Joulian Catherine  
Laperche Valérie  
Mauffret Aourell

### **Enoveo**

Monier Jean-Michel  
Sibourg Olivier

### **Genoscreen**

Ferreira Stéphanie

### **Sanofi**

Jeannin Pascale

### **Welience Agroenvironnement**

Blieux Anne-Laure



## Résumé

Dans une société où il devient urgent de réduire l'empreinte environnementale des activités humaines, la première étape est de pouvoir faire un diagnostic de la qualité de notre environnement et des différentes matrices le constituant (eau, sol, atmosphère, déchets). Les microorganismes, de par leur petite taille, leur énorme diversité taxonomique et génétique, leur réactivité aux perturbations ainsi que par leur forte implication dans les cycles biogéochimiques gérant les flux de matière et d'énergie, sont des candidats incontournables pour élaborer ce diagnostic. Ceci est d'autant plus vrai que depuis une vingtaine d'années, les fortes évolutions méthodologiques dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de sublimer les techniques d'étude de ces microorganismes dans l'environnement. Il devient maintenant important de faire un bilan de ces avancées méthodologiques et de pouvoir identifier, voire hiérarchiser, les techniques les plus à même de fournir des bio-indicateurs sensibles et robustes afin de développer le diagnostic environnemental. Constitués par un binôme technique moléculaire / marqueur génétique (taxonomique

ou fonctionnel), les bio-indicateurs peuvent en effet permettre de qualifier ou quantifier l'état microbiologique d'un environnement et renseigner, par exemple, sur l'impact d'une perturbation du système biologique étudié ou évalué. Dans un premier temps, l'ouvrage a pour objectif de décrire les différentes techniques relevant de la microbiologie moléculaire capable de caractériser l'abondance, la diversité, l'activité et les potentialités fonctionnelles des communautés microbiennes indigènes de diverses matrices environnementales (eau, sol, atmosphère, déchets...). Neufs fiches techniques sont proposées et expliquent l'intérêt et les limites des indicateurs qui en découlent. Dans un deuxième temps, l'ouvrage proposera une série de « fiches applications » illustrant des utilisations réelles de ces techniques pour évaluer ou remédier à l'impact des activités humaines (agricoles, industrielles, urbaines) sur les différentes matrices environnementales. L'ouvrage proposera ensuite un tableau de bord opérationnel pour effectuer un diagnostic de la qualité des matrices environnementales avec une vision à moyen terme pour les applications potentielles à venir.

## Abstract

In a society where it is becoming urgent to reduce the environmental footprint left by human activities, the first step is to be able to diagnose the quality of the environment and of its component matrices (water, soil, atmosphere, waste). Microorganisms are "must-candidates" for establishing this diagnosis, due to their infinitely small size, their huge taxonomic and genetic diversity, their sensitiveness to perturbations and their strong involvement in the biogeochemical cycles governing matter and energy flows. The huge progress achieved in molecular biology methodology over the last twenty years has deeply upgraded the techniques used to study microorganisms in the environment and has made their importance even more relevant. It is now important to review all these methodological improvements and to identify (even prioritize), the techniques best able to provide sensitive and robust bioindicators for the development of an environmental diagnosis.

These bioindicators consist of a combination of molecular technique and genetic marker (taxonomic or functional) and can be used to qualify or quantify the microbiological state of an environment e.g. provide information about the impact of a perturbation on the biological system under investigation. In this context, the first aim of this book is to describe the different molecular microbiology techniques able to characterize the abundance, diversity, activity and functional potentials of indigenous microbial communities in various environmental matrices (water, soil, atmosphere, waste...). "Data sheets" for the techniques potentially capable of detecting a relevant and robust indicator of the biological quality of our environment are provided in this section. The second section includes a series of "application sheets" showing how these techniques can be used to measure or remedy the impact of human activities (farming, industrial, urban) on different environmental matrices.



La microbiologie moléculaire a connu des progrès décisifs depuis un demi-siècle, ouvrant une nouvelle ère d'étude du monde microscopique.

Au cours des 20 dernières années, les possibilités offertes par le développement exponentiel des méthodologies dites « omiques » ont encore accéléré ce processus, au point que des champs entiers de connaissance qui semblaient jusqu'alors inaccessibles sont devenus des disciplines fertiles. Longtemps limitée par la difficulté à observer des microbes dont on ne connaissait pas les conditions de culture, la microbiologie inclut désormais l'étude des espèces uniquement décrites par leurs caractères moléculaires, et qui se sont révélées être la grande majorité des organismes présents dans l'environnement. Plus encore, la capacité à accéder à l'information génétique de communautés entières a transformé l'écologie microbienne. Portées par les progrès constants des méthodes moléculaires, dont le séquençage d'ADN à grande échelle, et ceux de l'informatique appliquée à l'analyse de ces données, les caractérisations de communautés microbiennes environnementales sont devenues de plus en plus précises, incluant description taxonomique et inventaire fonctionnel. Ces études commencent à présenter un intérêt qui n'est plus seulement lié à la connaissance fondamentale. Décrire l'état de communautés dans un environnement donné permet non seulement de mieux comprendre les cycles de la matière et de l'énergie qui y sont à l'œuvre, mais aussi d'estimer le niveau d'activité de cet environnement, et l'influence des perturbations qui peuvent le modifier.

L'influence des activités humaines sur les écosystèmes naturels est souvent décrite à l'échelle des macroorganismes. Déforestations, extinctions d'espèces animales ou transformations des paysages liées à l'essor de l'agriculture et de l'urbanisme sont en effet perçues de longue date comme liées au développement de l'humanité. L'importance majeure des microorganismes dans les écosystèmes, mise en évidence plus récemment, implique que l'on s'interroge sur l'impact de ces activités sur le monde microbien. De nombreuses études ont commencé à apporter des éléments sur le rôle d'espèces-clés, ou sur celui du maintien d'un réservoir de biodiversité microbienne, dans les services écosystémiques et leur résilience. Un des résultats majeurs de ces études a sans aucun doute été de découvrir une diversité insoupçonnée dans le monde microbien, bien supérieure à celle des plantes et des animaux. Cette diversité est en grande partie le reflet des milliards d'années pendant lesquels la vie a évolué sous une forme exclusivement monocellulaire, bien avant l'apparition de formes plus complexes. À l'échelle des écosystèmes, cela indique que les communautés microbiennes sont constituées d'espèces très différentes en interaction, dont la complémentarité explique sans doute une grande part des comportements d'ensemble. Mesurer les effets des changements en cours dans la biosphère sur ces nombreuses espèces, et tenter

de prédire leur comportement dans l'avenir proche est devenu un enjeu majeur de notre société. Mais comment établir un état de santé de notre environnement et des microorganismes qui l'habitent ? La vitesse même d'évolution des technologies moléculaires appliquées à l'identification microbienne peut sembler problématique. Face à des méthodes en amélioration constante, il devient difficile de sélectionner les plus adéquates en fonction de la grande diversité des matrices environnementales à analyser.

L'intérêt principal de cet ouvrage est de proposer une mise à jour des méthodes, et de leurs applications, dans l'analyse tant taxonomique que fonctionnelle des principaux environnements anthropisés. Il fait apparaître à travers des exemples concrets comment certaines espèces microbiennes peuvent servir de marqueur de l'état d'un écosystème. Il souligne l'importance, encore en partie mal établie, de la biodiversité dans les services écosystémiques, à travers une description des méthodes les plus récentes pour la caractériser. Enfin, il présente des exemples de détection à l'échelle du gène ou de la protéine, pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'œuvre dans les environnements étudiés.

L'avancée spectaculaire des méthodes moléculaires dans le diagnostic environnemental ne doit cependant pas cacher que ce domaine est encore émergent. Des changements plus conséquents sont à prévoir dans l'avenir, guidés par les progrès rapides des méthodes à haut débit. Le coût des tests protéomiques, métabolomiques et probablement plus encore génomiques, est appelé à baisser grâce aux nouvelles générations d'équipement dont on commence à appréhender l'efficacité. Ces technologies devraient à terme faire passer l'inventaire moléculaire des espèces microbiennes environnementales dans le champ des méthodes immédiatement abordables, ce qui ne manquera pas de mettre en lumière les difficultés liées à leur pleine interprétation. D'abord, la quantité d'information disponible nécessitera des méthodes informatiques rapides et robustes. Les analyses de communautés microbiennes ne seront efficaces que si des outils informatiques plus simples et plus rapides que ceux disponibles aujourd'hui sont développés. Ensuite, les connaissances fondamentales en écologie microbienne devront évoluer, incluant par exemple les analyses en réseaux d'espèces et de gènes, pour permettre que les données massives et complexes issues des technologies « omiques » ne restent pas en grande partie sous-utilisées. C'est à ces conditions que le domaine de la microbiologie moléculaire pourra utilement s'intégrer à une caractérisation détaillée de l'état des écosystèmes, à notre époque où des changements rapides et des pressions multiples accélèrent leur transformation.

**Patrick Wincker**

*Docteur en microbiologie et biologie moléculaire,  
directeur de recherche au Genoscope, CEA*



# Sommaire

<b>Avant-propos</b> Joëlle Kergreis, Directrice exécutive des programmes adjointe, ADEME .....	03
Les coordinateurs de l'ouvrage.....	04
Les contributeurs de l'ouvrage.....	05
Résumé.....	06
<b>Préface</b> Patrick Wincker (Docteur en microbiologie et biologie moléculaire, directeur de recherche au Genoscope, CEA).....	07
<b>Introduction</b>	
<b>La microbiologie moléculaire environnementale : historique, limites et potentialités</b> P.-A. Maron, L. Ranjard.....	12
<b>CHAPITRE 1</b>	
<b>Les techniques de microbiologie moléculaire : intérêts et limites pour le diagnostic environnemental</b> .....	16
<b>1 - Génomique et transcriptomique environnementale</b> .....	18
P. Peyret, A. Quaiser, A. Dufresne.....	18
1.1 - Du prélèvement des échantillons environnementaux à l'extraction des acides nucléiques .....	22
1.2 - Précautions à prendre pour l'analyse de l'ADN .....	22
1.3 - Précautions à prendre pour l'analyse de l'ARN .....	23
1.4 - Deux approches complémentaires pour étudier les microorganismes à partir de leurs acides nucléiques.....	24
1.4.1 - L'approche ciblée .....	24
1.4.1.1 - Empreintes moléculaires ou génétiques.....	26
1.4.1.2 - PCR quantitative : abondance des communautés microbiennes.....	26
1.4.1.3 - Séquençage d'amplicons (barcoding) .....	26
1.4.1.4 - Fish : Fluorescent <i>In situ</i> Hybridization .....	27
1.4.1.5 - Les biopuces à ADN.....	27
1.4.1.6 - Capture de gènes .....	28
1.4.2 - Approche globale : métagénomique et métatranscriptomique .....	29
1.4.2.1 - Métagénomique.....	29
1.4.2.2 - Métatranscriptomique .....	30
1.5 - Limites et incertitudes.....	31
<b>2 - Extraction et analyses des protéines : protéomique environnementale</b> .....	32
P.-A. Maron.....	32
2.1 - Définitions.....	32
2.2 - Aspects historiques : de la protéomique à la métaprotéomique.....	32
2.3 - Méthodologie : de l'extraction à l'identification des protéines.....	33
2.3.1 - Extraction des protéines par lyse directe.....	34
2.3.2 - Extraction des protéines par lyse indirecte.....	34
2.3.2 - Séparation et identification des protéines .....	34
2.3.4 - Approches ciblées.....	36
2.4 - Avantages et limites de l'approche de protéomique environnementale .....	36
<b>3 - Métabolomique environnementale : extraction et analyses des métabolites</b> .....	37
C. Roullier-Gall, L. Mazéas et P. Schmitt-Kopplin.....	37
3.1 - Définitions.....	37
3.2 - Les étapes techniques de la métabolomique.....	37
3.3 - Les techniques d'analyses du métabolome .....	38
3.4 - Application de la métabolomique aux matrices environnementales .....	38
3.5 - Conclusion : limites et incertitudes.....	39



<b>4 - Fiches techniques</b> .....	40
<i>Fiche technique 1</i> : Extraction ADN .....	42
<i>Fiche technique 2</i> : PCR quantitative .....	44
<i>Fiche technique 3</i> : Fish .....	46
<i>Fiche technique 4</i> : Empreintes moléculaires .....	48
<i>Fiche technique 5</i> : Séquençage amplicons.....	50
<i>Fiche technique 6</i> : Séquençage global .....	52
<i>Fiche technique 7</i> : Biopuces .....	54
<i>Fiche technique 8</i> : Capture de gènes par hybridation .....	56
<i>Fiche technique 9</i> : Métabotéomique .....	58

## CHAPITRE 2

<b>Application des techniques de microbiologie moléculaire pour le diagnostic de la qualité de différentes matrices environnementales</b> .....	60
---	----

<b>1 - Introduction sur le diagnostic de la qualité de différentes matrices environnementales</b> .....	60
---	----

### 2 - Matrice eau : « eaux naturelles et contaminées, sédiments »

<i>P. Cuny</i> .....	61
2.1 - Introduction sur la matrice eau .....	61
2.2 - Fiches applications eau .....	63
<i>Fiche application Eau 1</i> : Pollutions organiques et nutritives des cours d'eau révélées par les diatomées : complémentarité du metabarcoding et des approches traditionnelles .....	64
<i>Fiche application Eau 2</i> : Détection et quantification des cyanobactéries potentiellement toxiques en milieu lacustre ..	66
<i>Fiche application Eau 3</i> : Réponses des microorganismes eucaryotes lacustres aux pressions anthropiques et climatiques .....	68
<i>Fiche application Eau 4</i> : Identification moléculaire des sources de contamination fécale en rivière .....	70
<i>Fiche application Eau 5</i> : Diagnostic microbiologique des aquifères basé sur l'utilisation d'échantillonneurs microbiens passifs .....	72
<i>Fiche application Eau 6</i> : Diagnostic microbiologique d'un site multi-contaminé (COVH, oxyanions) .....	74
<i>Fiche application Eau 7</i> : Impact d'un cocktail de pesticides sur la biodiversité et l'activité bactérienne de la nappe alluviale de l'Ariège.....	76
<i>Fiche application Eau 8</i> : Diagnostic microbiologique de l'évolution d'une contamination pétrolière dans des sédiments intertidaux côtiers .....	78
<i>Fiche application Eau 9</i> : Diagnostic microbiologique de l'impact d'une contamination pétrolière sur un étang hypersalé : évaluation des capacités d'autoépuration .....	80
<i>Fiche application Eau 10</i> : Évaluation des potentialités métaboliques des communautés microbiennes contribuant à la restauration d'environnements pollués par des approches de biopuces ADN.....	82

### 3 - Matrice sol

<i>L. Ranjard</i> .....	84
3.1 - Introduction.....	84
3.2 - Fiches applications sol .....	85
<i>Fiche application Sol 1</i> : Effets du travail du sol sur sa qualité microbiologique .....	86
<i>Fiche application Sol 2</i> : Diagnostic microbiologique de l'impact des amendements organiques vs engrais chimiques sur la qualité des sols .....	88
<i>Fiche application Sol 3</i> : Diagnostic microbiologique de la qualité d'un sol soumis à une faible utilisation d'herbicides (protection intégrée des cultures) .....	90
<i>Fiche application Sol 4</i> : Diagnostic microbiologique de la qualité des sols français à l'échelle nationale en fonction de leur mode d'usage. Partie I : Biomasse moléculaire microbienne.....	92
<i>Fiche application Sol 5</i> : Diagnostic microbiologique de la qualité des sols français à l'échelle nationale en fonction de leur mode d'usage. Partie II : Inventaire diversité microbienne.....	94



<i>Fiche application Sol 6</i> : Diagnostic microbiologique de la qualité des sols d'un réseau national de parcelles agricoles en grande culture et viticulture (Agrinnov) .....	96
<i>Fiche application Sol 7</i> : Évaluation du risque de toxicité du mercure sur les communautés microbiennes.....	98
<i>Fiche application Sol 8</i> : Impact de l'arsenic sur les communautés microbiennes du sol.....	100
<i>Fiche application Sol 9</i> : Évaluation de la faisabilité de traitement de sols pollués par bioremédiation.....	102
<i>Fiche application Sol 10</i> : Diagnostic microbiologique de la qualité d'un sol soumis à des traitements pesticides.....	104
<i>Fiche application Sol 11</i> : Impact des amendements organiques et des eaux usées sur la dispersion de microorganismes pathogènes.....	106
<i>Fiche application Sol 12</i> : Évaluation des potentialités métaboliques des communautés microbiennes issues de sols pollués par des pesticides par une approche de capture de gènes par hybridation.....	108

#### **4 - Matrice atmosphère**

<i>J.-J Godon</i> .....	110
4.1 - Introduction pour le milieu atmosphère.....	110
4.2 - Fiches application atmosphère .....	111
<i>Fiche application Atmosphère 1</i> : Identification de bio-indicateurs d'émission d'aérosol par les plateformes de compostage .....	112
<i>Fiche application Atmosphère 2</i> : Établir le niveau d'anthropisation d'airs intérieurs.....	114

#### **5 - Matrice déchets pour l'environnement**

<i>T. Bouchez</i> .....	116
5.1 - Introduction sur les matrices déchets pour l'environnement .....	116
5.2 - Fiches application Déchets .....	117
<i>Fiche application Déchets 1</i> : Diagnostic de l'hydrolyse et de la méthanisation de déchets cellulosiques à l'aide d'approches métaprotéomiques .....	118
<i>Fiche application Déchets 2</i> : Diagnostic des dynamiques méthanogènes au sein de bioprocédés de méthanisation : couplage d'approches isotopiques et méta-omiques.....	120
<i>Fiche application Déchets 3</i> : Diagnostic des dysfonctionnements biologiques en station d'épuration.....	122
<i>Fiche application Déchets 4</i> : Exploitation des microorganismes en tant que bio-indicateurs de perturbation des milieux naturels .....	124
<i>Fiche application Déchets 5</i> : Caractérisation de biofilms électroactifs par séquençage de ribotags d'ARNr 16S et observation Fish .....	126
<i>Fiche application Déchets 6</i> : Diagnostic microbiologique du biofouling .....	128
<i>Fiche application Déchets 7</i> : Optimisation des biopiles microbiennes : comment sélectionner des microorganismes efficaces sur les biocathodes.....	130

## **CHAPITRE 3**

### **Opérationnalité des techniques de diagnostic en microbiologie moléculaire environnementale**

<i>A.-L. Blieux, S. Dequiedt, O. Sibourg et S. Ferreira</i> .....	132
---	-----

<b>1 - Une vision globale des techniques et applications présentées</b> .....	132
---	-----

<b>2 - Des techniques éprouvées pour la caractérisation des microorganismes et de leurs fonctions dans les matrices environnementales</b> .....	133
---	-----

2.1 - Notion de technique éprouvée.....	133
---	-----

2.2 - Synthèse des techniques et de leurs applications.....	133
---	-----

<b>3 - Des bio-indicateurs opérationnels au service du diagnostic environnemental</b> .....	136
---	-----

3.1 - Notion de bio-indicateurs opérationnels .....	136
---	-----

3.2 - D'une technique éprouvée à un bio-indicateur opérationnel .....	136
---	-----

3.3 - Opérationnalité de bio-indicateurs de diagnostic au travers des exemples d'application.....	137
---	-----



<b>Conclusion</b> .....	146
Références bibliographiques .....	147
Index des figures et tableaux .....	157
Glossaire, sigles et acronymes .....	161



# Introduction

## La microbiologie moléculaire environnementale : historique, limites et potentialités

P.-A. Maron et L. Ranjard

### Les écosystèmes et les services rendus

Le sol, les sédiments, l'eau, l'air représentent les matrices environnementales essentielles qui forment, avec les êtres vivants, la diversité des écosystèmes sur Terre. Ces éléments constitutifs des écosystèmes développent un réseau d'échange d'énergie et de matière permettant le maintien et le développement de la vie. D'un point de vue plus « anthropocentrique », les écosystèmes soutiennent des processus vitaux et procurent de nombreux services pour le bien-être de l'humain et l'ensemble de ses activités économiques. Ces services comprennent notamment la fourniture de nourriture, d'eau, de bois et de carburant, la purification de l'air et de l'eau, le recyclage des déchets, la formation et la fertilité des sols, la pollinisation... l'ensemble pouvant représenter une valeur monétaire de 30 000 milliards de dollars US par an à l'échelle de la planète (Constanza *et al.*, 1997).

La bonne qualité d'un écosystème garantit la quantité et la qualité des services qu'il fournit. Elle est conditionnée par l'intégrité des multiples interactions biologiques qui s'y déroulent et de ses processus écologiques. Au cours du xx<sup>e</sup> siècle, l'intensification des activités humaines (agriculture, activités industrielles, urbanisation, pêche intensive, accumulation de déchets, etc.) nécessaire pour satisfaire une demande sans cesse grandissante, a provoqué une altération de notre environnement, dans ses dimensions physiques, chimiques autant que biologiques. D'après l'Évaluation des écosystèmes pour le millénaire (MEA, 2005), ces dégradations ont entraîné une diminution estimée à 60 % des services écosystémiques au cours des 50 dernières années. Ce constat pose aujourd'hui clairement le problème de la durabilité de notre bien-être ainsi que de notre développement économique et social futur. La conscience grandissante de cet état de fait a fait naître le besoin de définir de nouveaux modes d'usage et de gestion des écosystèmes, adaptés à leur préservation et à leur utilisation durable (Rames *et al.*, 2013). Pour atteindre cet objectif, le développement d'une gamme d'indicateurs pouvant rendre compte de la qualité/santé des écosystèmes est donc indispensable. Constitués par un binôme technique moléculaire / marqueur génétique (taxonomique ou fonctionnel), les indicateurs moléculaires microbiens peuvent permettre de qualifier ou quantifier l'état microbiologique d'un environnement et de renseigner, par exemple, sur l'impact d'une perturbation du système biologique étudié ou évalué.

Parmi les altérations de l'environnement mises en évidence depuis la fin du xx<sup>e</sup> siècle, la perte de biodiversité enregistrée à l'échelle planétaire est l'une des plus préoccupantes. L'Évaluation des écosystèmes pour le millénaire a ainsi montré que le taux d'extinction des espèces a augmenté d'un facteur 10, 100 voire 1 000 dans certains écosystèmes

depuis le début de l'ère industrielle (Lawton et May, 1995 ; MEA, 2005, fig.1). Toutefois, pour les microorganismes, ce type de bilan est difficile à faire par manque de systèmes d'observation anciens de la diversité microbienne des écosystèmes naturels, mais aussi par manque d'outils puissants et robustes pour aborder la grande diversité microbienne dans ces écosystèmes.

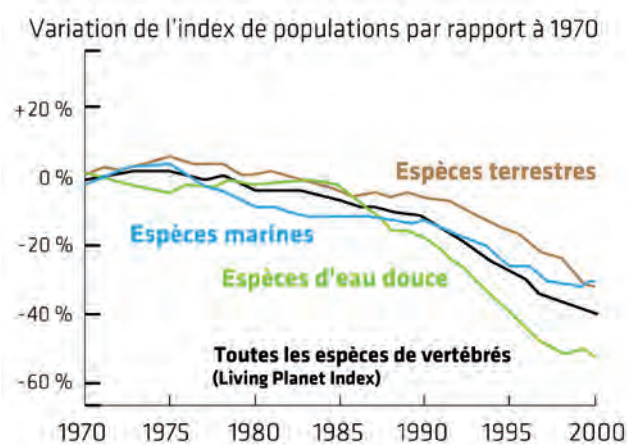


Figure 1. Perte de biodiversité des écosystèmes aquatiques et terrestres. Source : MEA, 2005.

Une telle perte de biodiversité entraîne une modification des processus biologiques et de la stabilité des écosystèmes (Balavanera *et al.*, 2006), de nature à compromettre ou détruire les fonctions et donc les services rendus par ces derniers. En effet, nombre de ces services dérivent de processus biologiques et écologiques déterminés par la diversité et la composition des communautés d'organismes vivants (Coleman et Whitman, 2004). Même s'il est très difficile de relier les pertes de biodiversité à un coût financier, ce capital naturel doit être préservé non seulement pour des raisons éthiques, mais aussi pour des raisons écologiques et économiques. En conséquence, les propriétés biologiques des matrices environnementales, et notamment les organismes vivants indigènes de ces matrices (animaux, végétaux, microorganismes), se positionnent logiquement comme de bons candidats pour la mise au point d'indicateurs de la performance des écosystèmes (Ritz *et al.*, 2009).

### Les microorganismes : clés de voûte des écosystèmes

De tous les organismes vivant sur Terre, c'est dans le monde de l'invisible, de « l'infiniment petit », que l'on trouve la diversité biologique la plus importante. En effet, grâce à une extraordinaire capacité d'adaptation génétique aux variations de leur environnement, les microorganismes (qui comprennent en majorité les bactéries et les champignons) ont colonisé, sans exception, l'ensemble des

écosystèmes de notre planète. Ainsi, en plus des milieux offrant des conditions favorables au développement de la vie, on trouve des microorganismes dans des milieux aux conditions extrêmes tels que les déserts chauds et secs, les glaciers, les sources hydrothermales, les sous-sols profonds, la haute atmosphère, les milieux maritimes, y compris les abysses ou les milieux hypersalins... Cette répartition ubiquitaire des microorganismes s'explique par l'extraordinaire diversité génétique qui caractérise le monde microbien. Ainsi, on estime qu'un million d'espèces de bactéries et 100 000 espèces de champignons peuplent un gramme de sol ; 10 000 et jusqu'à 100 000 espèces bactériennes un millilitre d'eau et un mètre cube d'air respectivement. Au-delà de la diversité génétique, ces communautés représentent également une part très importante de la biomasse vivante dans les écosystèmes. On peut citer pour exemple la biomasse microbienne du sol qui peut représenter de 2 à 10 tonnes de carbone par hectare, soit l'équivalent d'une dizaine de vaches pâurant sur la même surface !

Cette richesse formidable confère aux microorganismes une place particulière au sein du règne du vivant en termes de réservoir de ressources génétiques, celui-ci pouvant être considéré comme un véritable patrimoine. L'énorme diversité des microorganismes se traduit également par une implication forte dans les fonctions et les services écosystémiques assurés par les matrices environnementales. Ainsi, les communautés microbiennes contribuent aux services de soutien, notamment à travers leur rôle dans les cycles biogéochimiques d'éléments majeurs tels que le carbone, l'azote, le phosphore, le soufre... La composante microbienne est, par exemple, responsable des transformations du cycle de l'azote comme la fixation de l'azote atmosphérique, l'ammonification, la

nitrification et la dénitrification (Hayatsu *et al.*, 2008). De même, la minéralisation de la matière organique, processus central du cycle du carbone, se réalise en grande partie par les microorganismes qui transforment des molécules organiques complexes en éléments minéraux, dont certains sont facilement assimilables par les plantes. De par leur plasticité métabolique, les microorganismes interviennent aussi dans la dégradation et le transfert de polluants (métaux, pesticides...) dans l'environnement. Certains microorganismes ont également un impact important sur la santé et la croissance des plantes en réalisant par exemple des symbioses (Barrios, 2007) ou en induisant des maladies.

### De la microbiologie pasteurienne à la microbiologie moléculaire

Comme tous les êtres vivants, les communautés microbiennes vivent en interaction avec leur environnement. Elles répondent de façon très sensible aux changements des conditions environnementales et cela peut se traduire par des modifications de biomasse, de diversité et d'activité (Pulleman *et al.*, 2012 ; Sharma *et al.*, 2011). L'écologie microbienne, la science qui étudie ces interactions dans les écosystèmes, est un domaine scientifique encore relativement jeune puisqu'il est apparu au milieu du xx<sup>e</sup> siècle. Son développement s'est longtemps heurté à la difficulté d'appréhender l'étude des microorganismes dans leur environnement en raison notamment de (1) leur taille microscopique, (2) de leur extraordinaire diversité, et (3) de leur distribution et inaccessibilité dans des matrices environnementales hétérogènes. Depuis 50 ans, l'acquisition des connaissances sur les communautés microbiennes a suivi une progression saltatoire, c'est-à-dire avec différentes étapes successives considérées comme des avancées significatives tant technologiques que conceptuelles (fig. 2 ; Maron *et al.*, 2007).

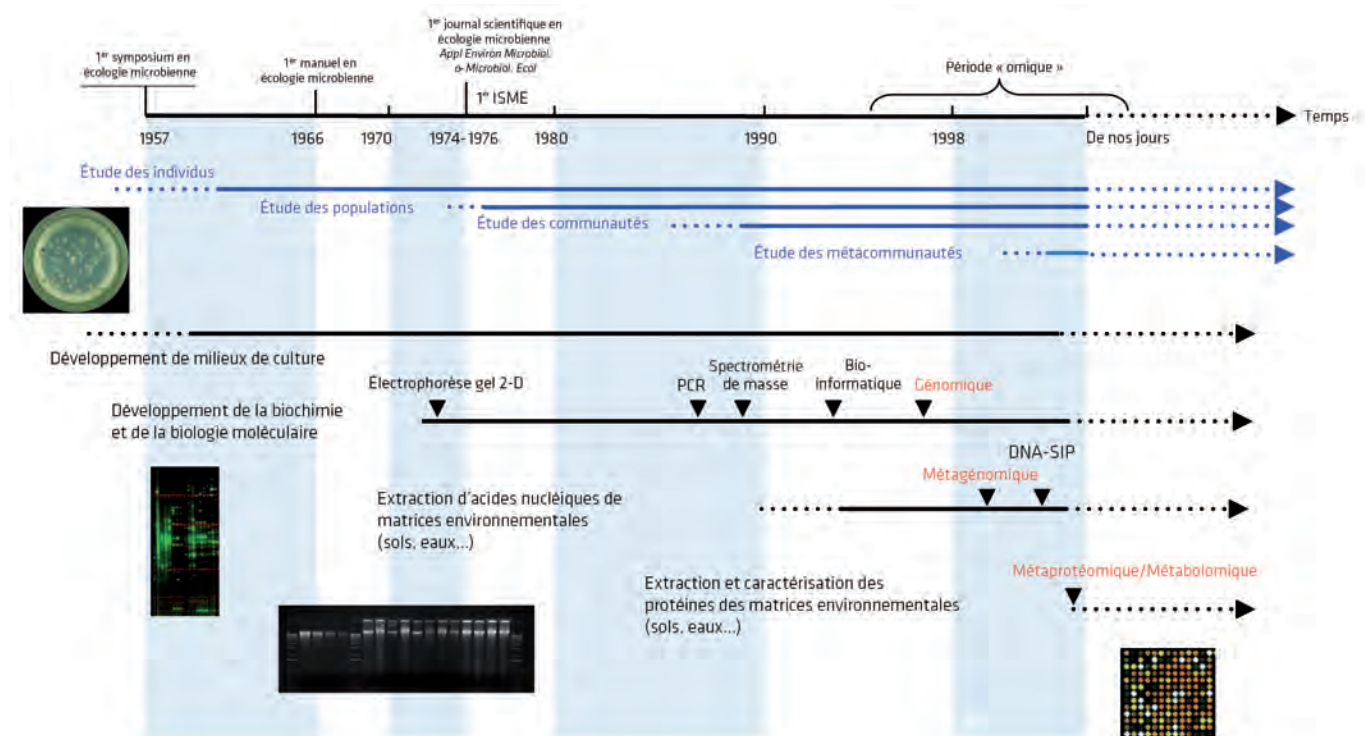


Figure 2. Historique et évolution saltatoire de l'écologie microbienne. D'après Maron *et al.*, 2011.



Ainsi, dans les années 1960, les premiers travaux basés sur les postulats des écoles de Koch ou de Pasteur portaient sur l'étude de souches pures de microorganismes cultivées au laboratoire, sans nécessairement considérer les interactions entre ces organismes et leur habitat. Les outils mobilisés à l'époque sont qualifiés de méthodes de microbiologie pasteurienne (isolement et croissance sur des milieux de culture, observations au microscope, etc.).

Actuellement, ces méthodologies sont toujours utilisées mais dans des contextes particuliers (études ou détection de souches particulières). Dans les années 1980, le développement de nouvelles approches moléculaires basées sur l'extraction et la caractérisation de l'ADN extrait de l'environnement (eau, sol, sédiments) a révolutionné l'analyse des communautés microbiennes dans l'environnement. En permettant aux microbiologistes de franchir le stade de l'étude du microorganisme isolé, pour passer à l'analyse des communautés microbiennes dans leur environnement naturel, ces outils moléculaires ont positionné l'écologie microbienne parmi les domaines-clés de l'écologie moderne.

L'aboutissement de ces développements est représenté aujourd'hui par l'ère des approches « omiques », par référence à la possibilité de caractériser la diversité génétique et fonctionnelle des microorganismes dans leur ensemble, sans *a priori* et par l'analyse en haut débit des ADN (génomique), ARN (transcriptomique), protéines (protéomique) ou des métabolites (métabolomique). Ces technologies, telles que la génomique et le séquençage de l'ADN à grande échelle, sont apparues parallèlement au développement du projet Génome humain dans les années 1990 et ont été rapidement adaptées à l'étude des communautés d'êtres vivants, et notamment des microorganismes, dans les écosystèmes naturels.

### **Le nouveau paradigme des « omiques »**

En plus d'augmenter le débit (c.-à-d. d'augmenter le nombre d'échantillons analysés et le nombre de données obtenues pour chaque échantillon), les technologies « omiques » ont fondamentalement modifié les stratégies de recherche. Habituellement, les scientifiques se basent sur des hypothèses de recherche dans lesquelles les questions sont clairement articulées. Ils obtiennent ensuite des données qui viendront confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Avec les technologies « omiques », la stratégie consiste maintenant souvent à rassembler de nombreuses données génomiques, transcriptomiques ou protéomiques au sein d'un environnement avec une hypothèse de recherche initiale plutôt basée sur l'exploration, puis à attendre la production de ces données avant de tester différentes hypothèses biologiques. On parle alors de *Data Driven Science* ou « science pilotée par les données ». Ce type de stratégie, tout d'abord développé dans le monde médical, voit aujourd'hui certaines applications dans les sciences de l'environnement et plus particulièrement dans le monde de l'écologie microbienne. Par exemple, les études de biogéographie microbienne (étude de la diversité des communautés microbiennes à grande échelle, telle que territoire, continent, planète) menées

ces dix dernières années ont typiquement été réalisées selon cette stratégie exploratoire et ont débouché sur le développement de nouveaux concepts en écologie microbienne comme l'application de la relation aire-espèce (Ranjard *et al.*, 2013). D'un point de vue plus finalisé, de telles approches permettent aussi de compiler de grands jeux de données sur l'abondance, la diversité et l'activité des microorganismes en fonction de la variation des conditions de l'environnement et permettent d'initier l'élaboration de référentiels d'interprétation pour le diagnostic robuste de la qualité des écosystèmes.

### **La microbiologie moléculaire au service du diagnostic environnemental**

Pour contribuer à l'établissement d'un diagnostic pertinent de la qualité de l'environnement, les indicateurs microbiologiques doivent rendre compte de son fonctionnement et être sensibles aux modifications de ses conditions (Rames *et al.*, 2013 ; Pulleman *et al.* 2012). À cet égard, les communautés microbiennes offrent un potentiel important puisque, comme évoqué précédemment, elles sont (1) présentes avec une forte densité et diversité dans tous les environnements, (2) fortement impliquées dans le fonctionnement biologique et les services rendus par les écosystèmes, et (3) elles répondent de façon très sensible aux changements des conditions environnementales en termes de modification de biomasse, de structure, de diversité et d'activité. Toutefois, les bio-indicateurs microbiologiques doivent également répondre à des critères pratiques et économiques (c.-à-d. simples à mettre en œuvre et à interpréter, rapides, reproductibles, peu onéreux, accessibles aux utilisateurs...) et être associés à des référentiels permettant de positionner les valeurs mesurées dans une gamme de variabilité opérationnelle (faible/normal/élevé) afin de permettre l'établissement du diagnostic désiré (Pulleman *et al.*, 2012 ; Ritz *et al.*, 2009).

Bien que la plupart des méthodes développées au cours des 30 dernières années pour caractériser les communautés microbiennes *in situ* aient été proposées pour l'élaboration d'indicateurs de la qualité des matrices environnementales, toutes ne remplissent pas réellement ces différents critères. Le plus limitant étant l'absence de procédures standardisées et de référentiels associés à ces indicateurs.

À ce jour, il est donc nécessaire de faire un bilan sur ces indicateurs et surtout sur les potentialités des outils relevant de la microbiologie moléculaire pour fournir de nouveaux indicateurs de qualité des écosystèmes répondant à tous les prérequis décrits ci-dessus.

Dans le contexte qui a été exposé, cet ouvrage a pour objectif de décrire les différentes techniques relevant de la microbiologie moléculaire en termes d'état d'avancement, de limites techniques et de sensibilité pour étudier l'abondance, la diversité et les potentialités fonctionnelles des communautés microbiennes indigènes de matrices environnementales diverses (eau, sol, air, déchets) (chapitre I). À ce niveau, des fiches techniques seront fournies pour chaque outil moléculaire ayant une forte potentialité pour le développement de bio-indicateurs.

Dans le chapitre II, nous présenterons également et de façon non exhaustive sous forme de fiches les applications réelles des techniques décrites dans le chapitre I et effectuées à ce jour dans le domaine de l'étude d'impact des activités humaines (agricoles, industrielles, urbaines...) sur les différentes matrices environnementales (eau, sol, air, déchets). Certaines de ces applications ont été accompagnées par l'ADEME. Cet ouvrage vient compléter la synthèse ADEME intitulée « Les outils de biologie moléculaire et leur utilisation dans le domaine de la gestion des sites pollués » (2015).

Dans cet ouvrage, les stratégies d'échantillonnage des différents indicateurs ne seront identifiées que pour certains cas d'étude car un inventaire exhaustif, dépendant de la matrice étudiée, de l'indicateur utilisé et de la question posée, nécessiterait un ouvrage entier à lui seul.

Il est toutefois important de bien garder à l'esprit que, quels que soient la qualité et le niveau d'opérationnalité d'un bio-indicateur, un mauvais plan d'échantillonnage pourra conduire à des résultats non représentatifs de l'état ou du système biologique étudié. Toute stratégie de diagnostic environnemental devra donc impérativement prendre en compte un plan d'échantillonnage rigoureux et adapté à la matrice étudiée.

Dans son chapitre III, l'ouvrage proposera un tableau de bord des outils de microbiologie moléculaire pour effectuer un diagnostic de la qualité des matrices environnementales présentant le niveau d'opérationnalité des différents bio-indicateurs.

