

Vision écosystémique des procédés de dépollution :

Les acteurs

Les outils

Les concepts

Jean-Jacques Godon

INRA, UR050

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement,

Narbonne, F-11100

Quels acteurs ?

Particularité des écosystèmes de dépollution !

Systemes ouverts non stériles

Flores en transit et résidente

Développement et connaissances majoritairement empirique

Systemes complexes

Développement empirique

En 1865 est établie la « Royal Commission on River Pollution »

Auto-épuration par les sédiments



Fig. 1 Structures at Manchester-Davyhulme WWTP from the times of Arden and Lockett.



Fig. 2 Existing buildings at Manchester-Davyhulme WWTP from the times of Arden and Lockett



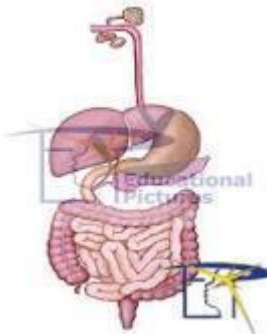
Figure 3 Sheffield aeration system at Stockport WWTP from 1924-1927.



Développement empirique aussi !



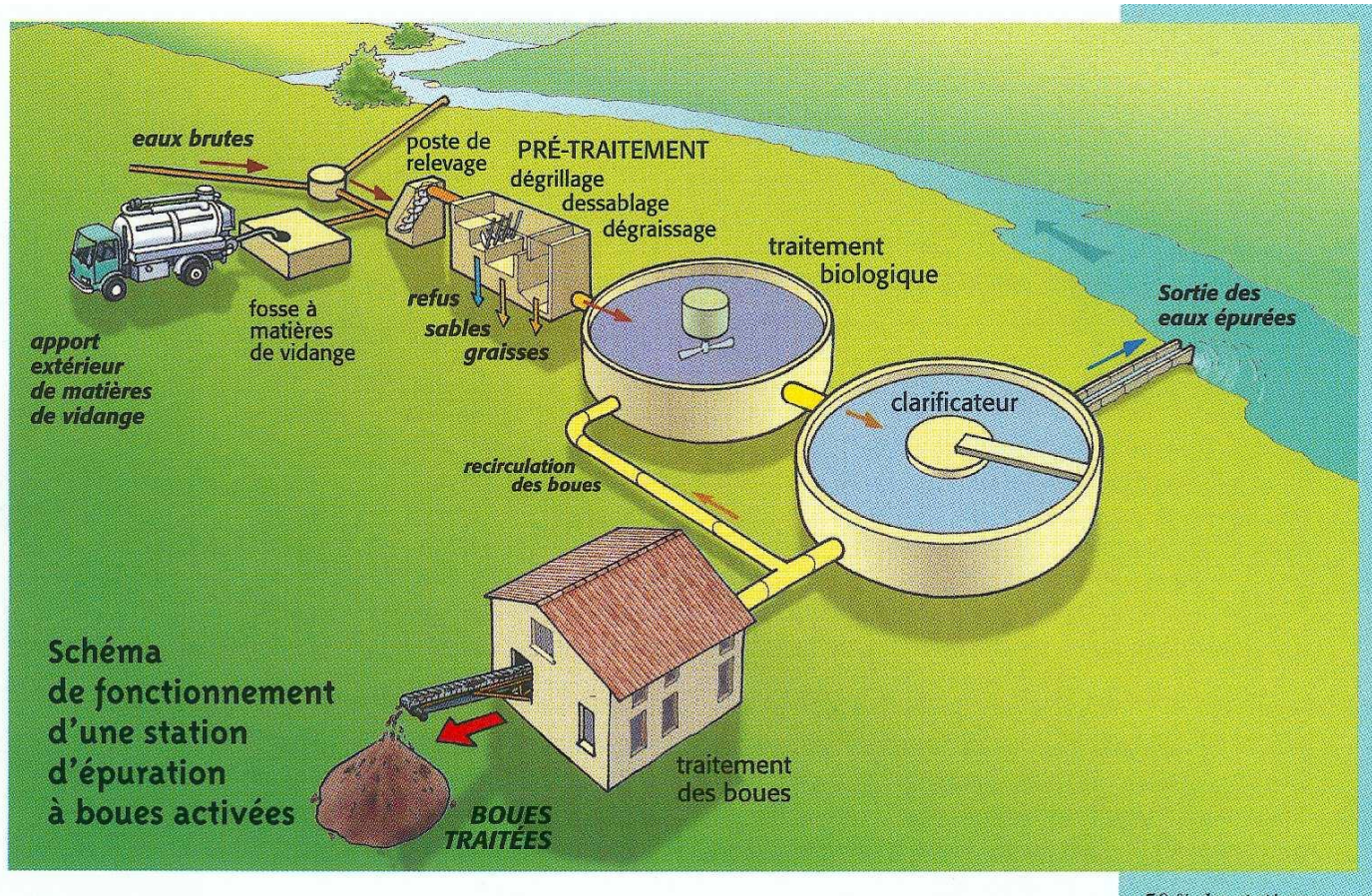
Systemes continus



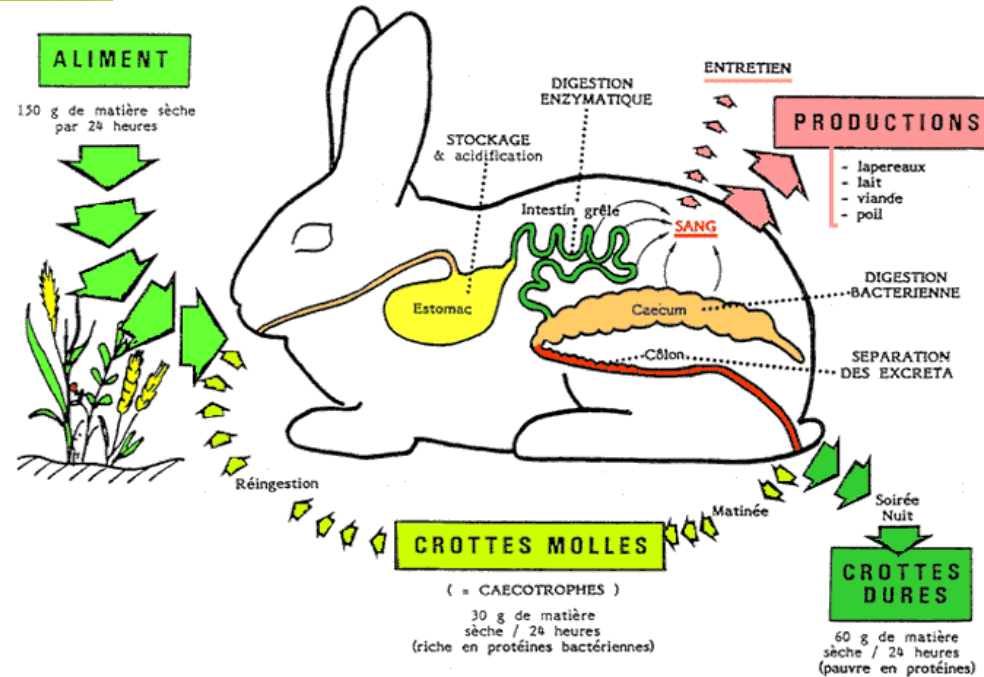
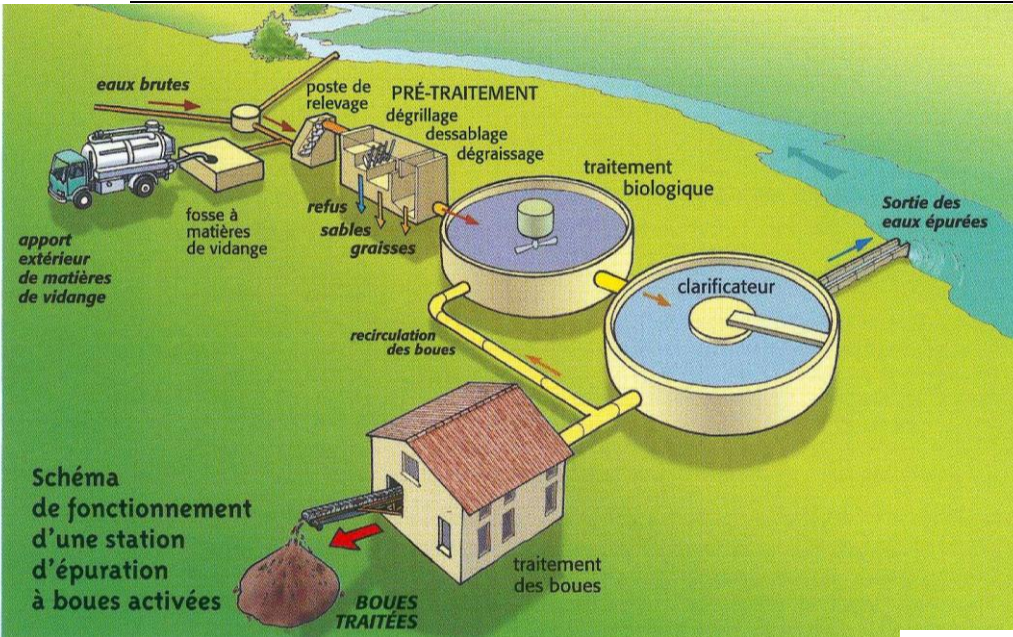
Systemes 'batch'



Un procédé de transformation de la matière organique



Deux procédés de transformation de la matière organique



Quels microbes ?

Quel écosystème microbien ?

dechets



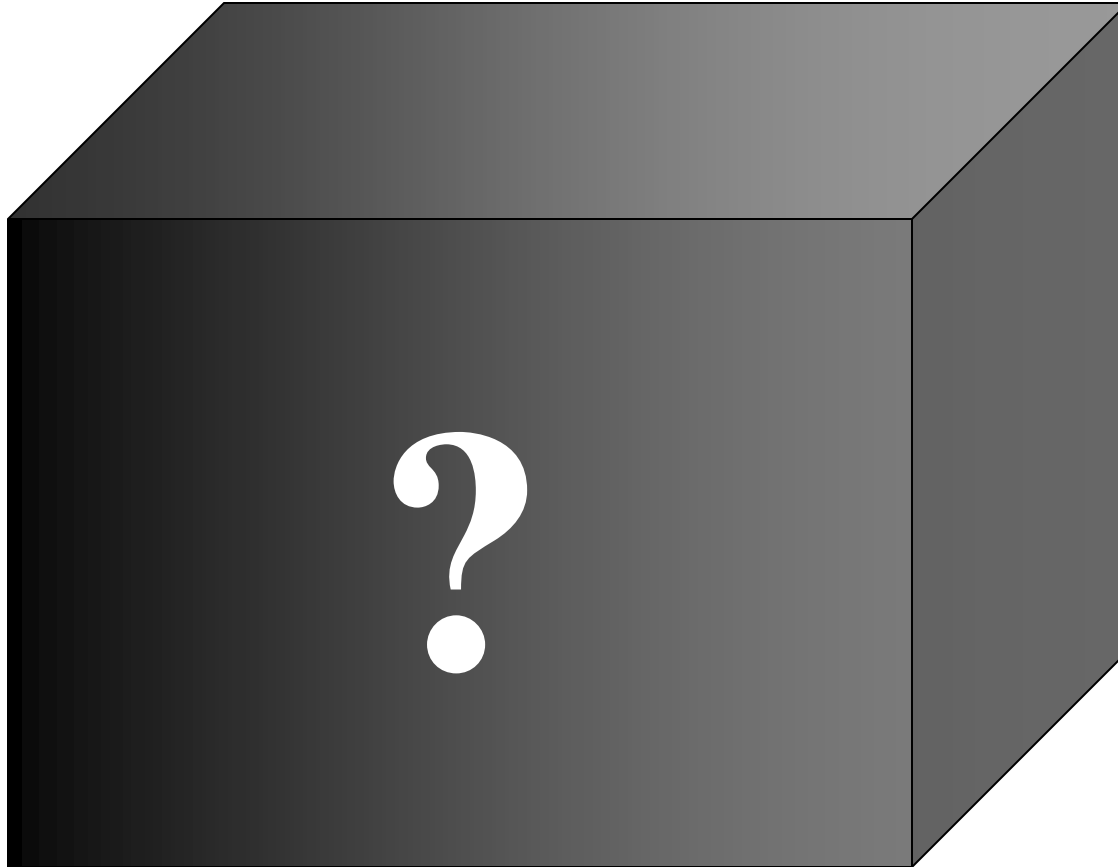
Microbes
actifs et
passifs

Air (biogas)

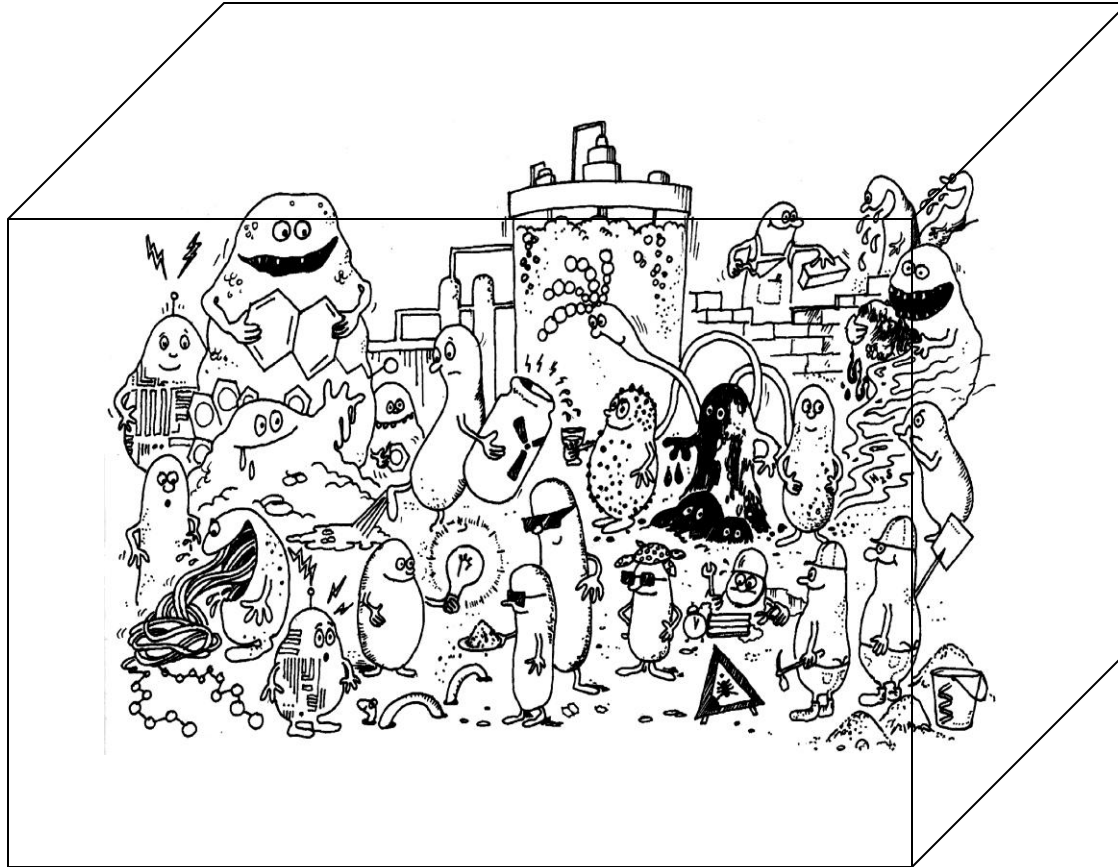
eau

boues

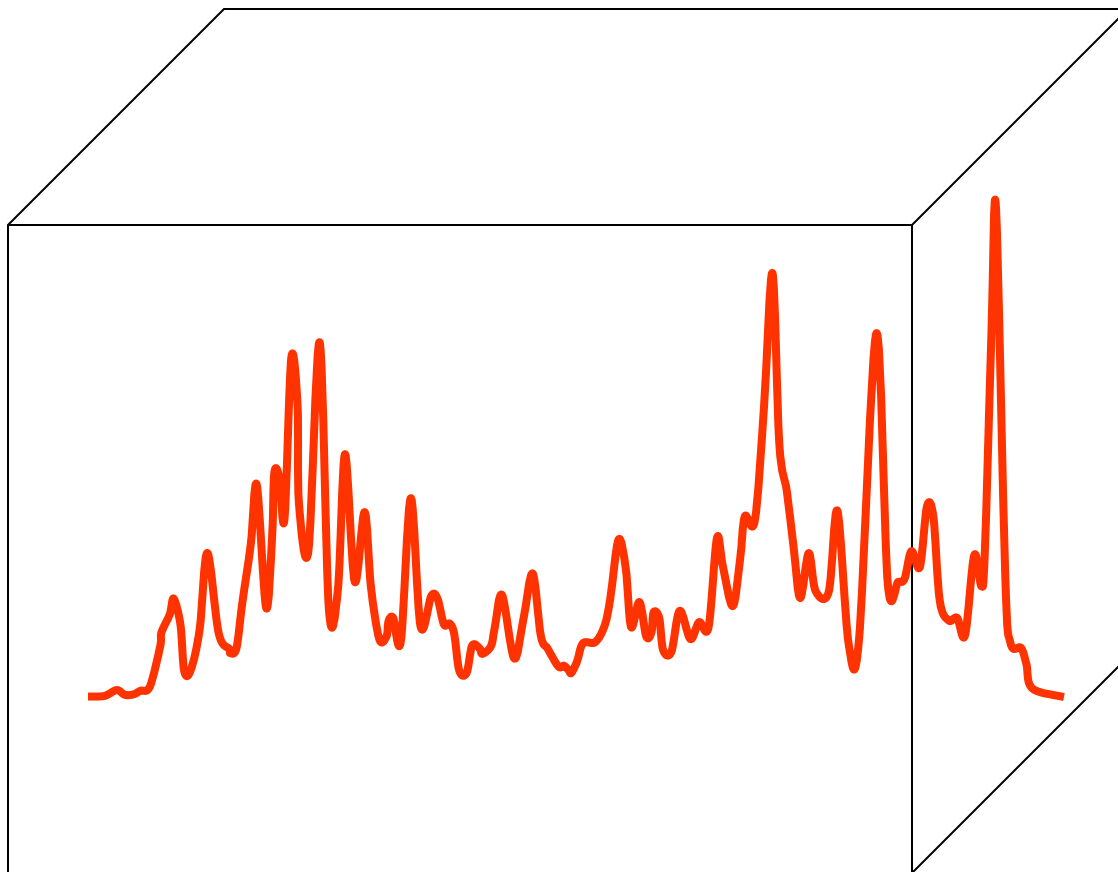
Obtenir une représentation microbiologique de la boîte noire



Est-ce comme ceci ?



Mais ... On ne sait voir que cela !



Le monde observé



Le monde vrai



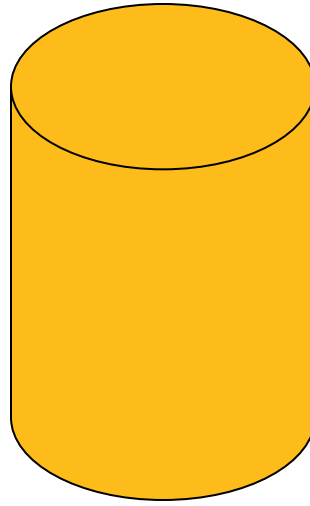
Le monde observé



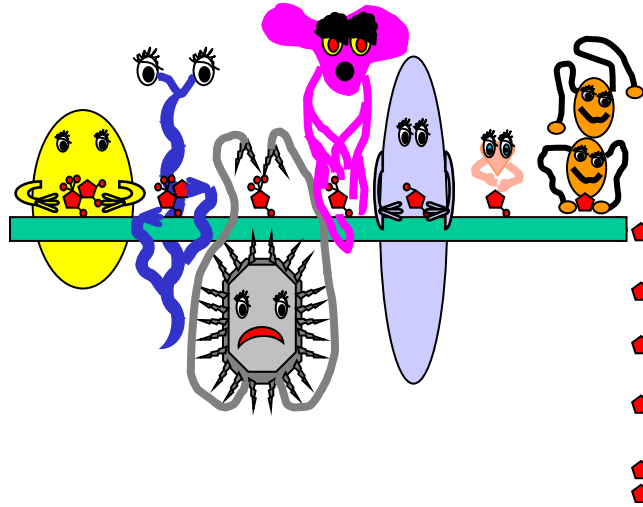
Le monde vrai



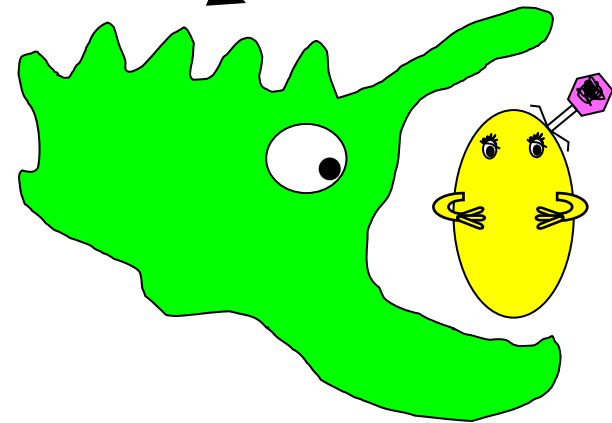
Black box



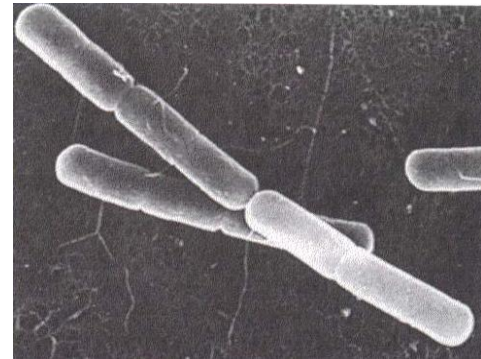
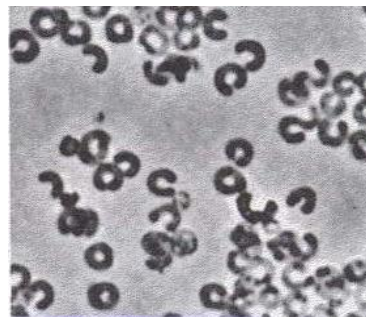
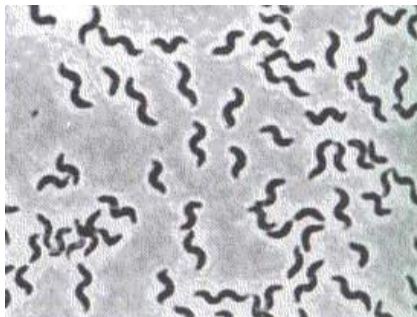
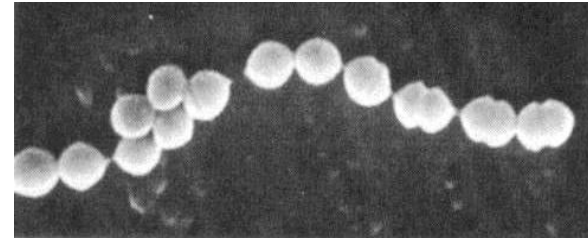
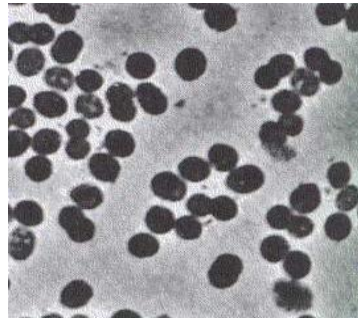
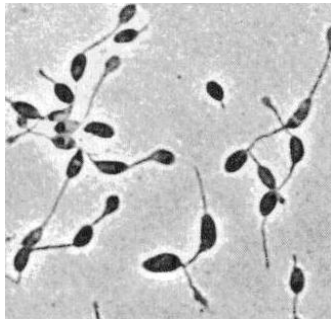
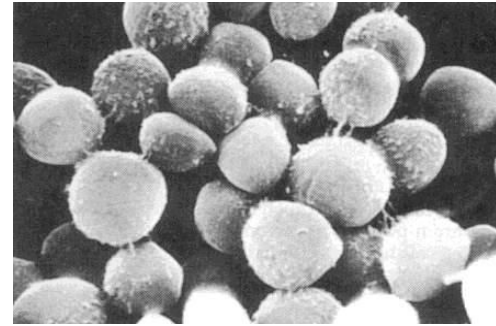
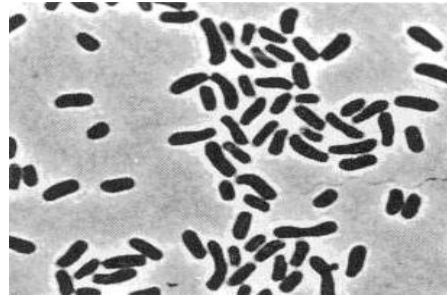
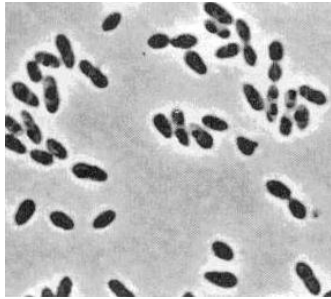
Microbiologist view



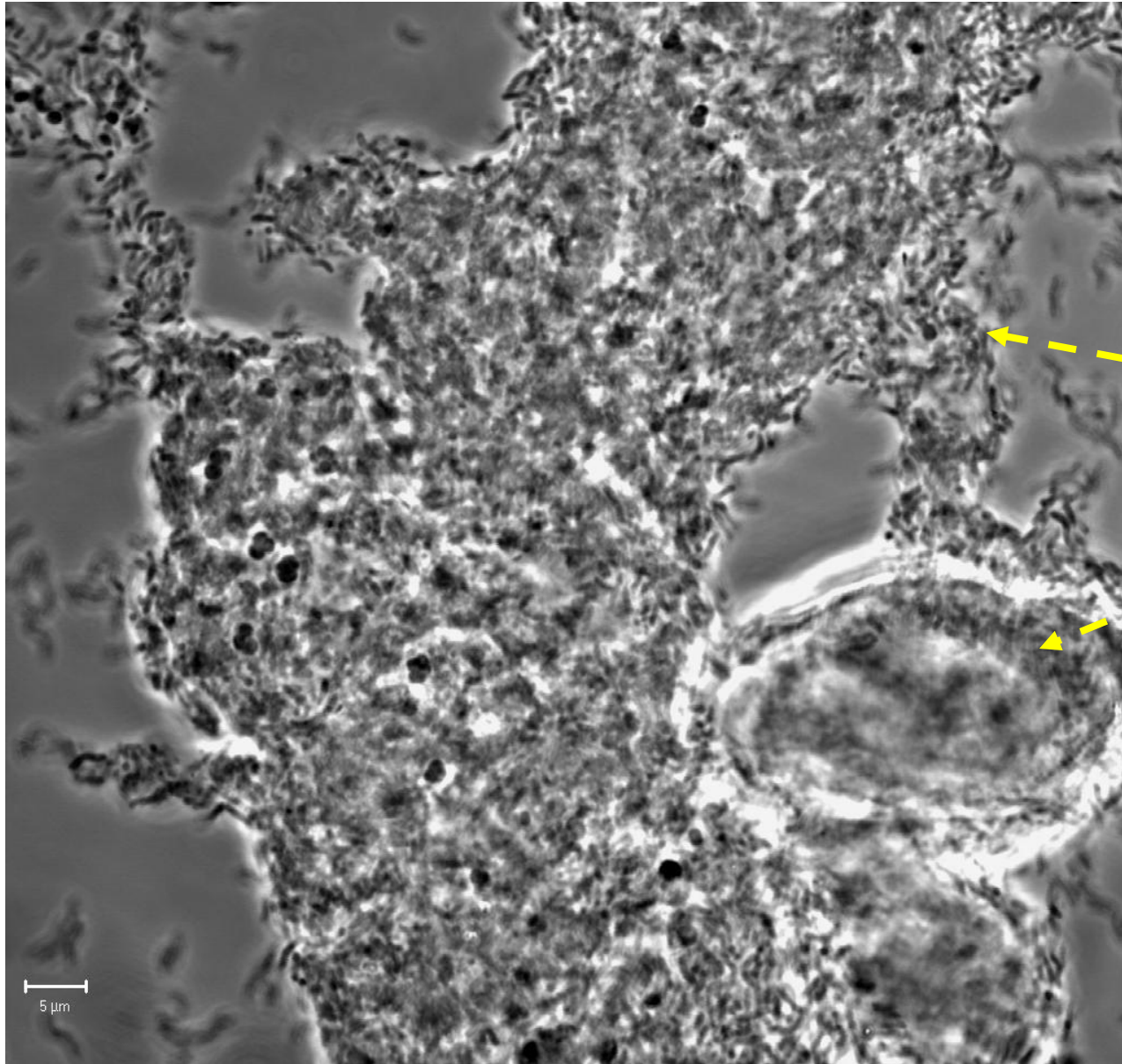
Engineer view



Ecologist view



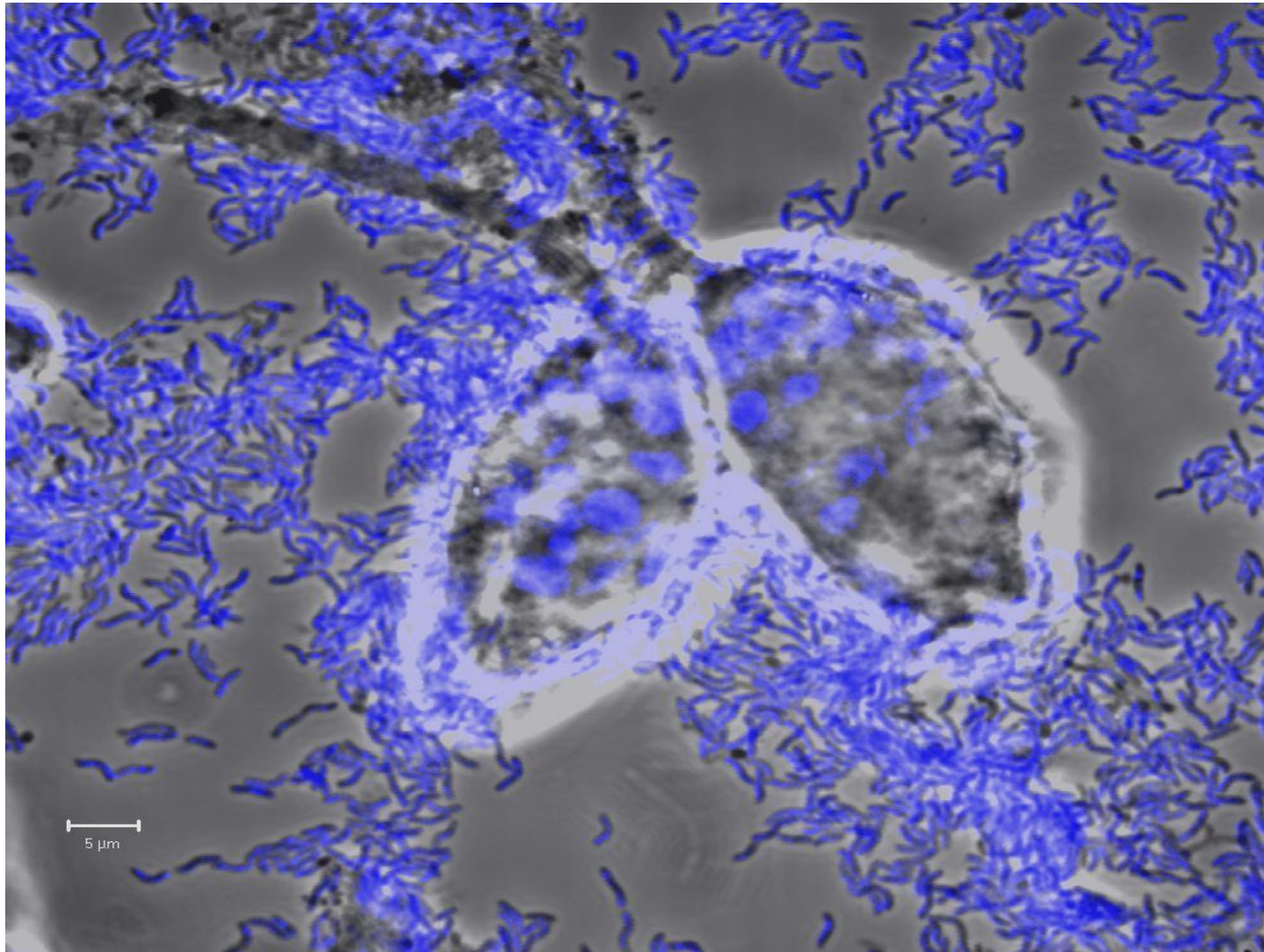
Microscopie boues activées



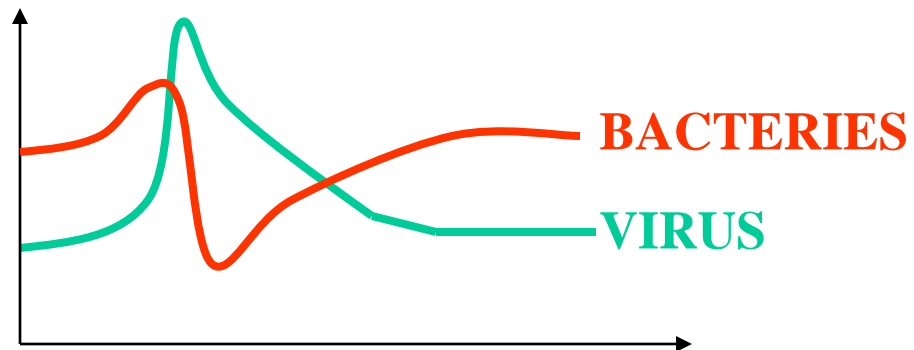
Bactéries

Protozoaire

Bacteriophage grazing during bio-augmentation by *Microcylunatus aerodenitrificans* (aerobic denitrification) in nitrifiant ecosystem



Zoom on an important environmental parameter : the virus



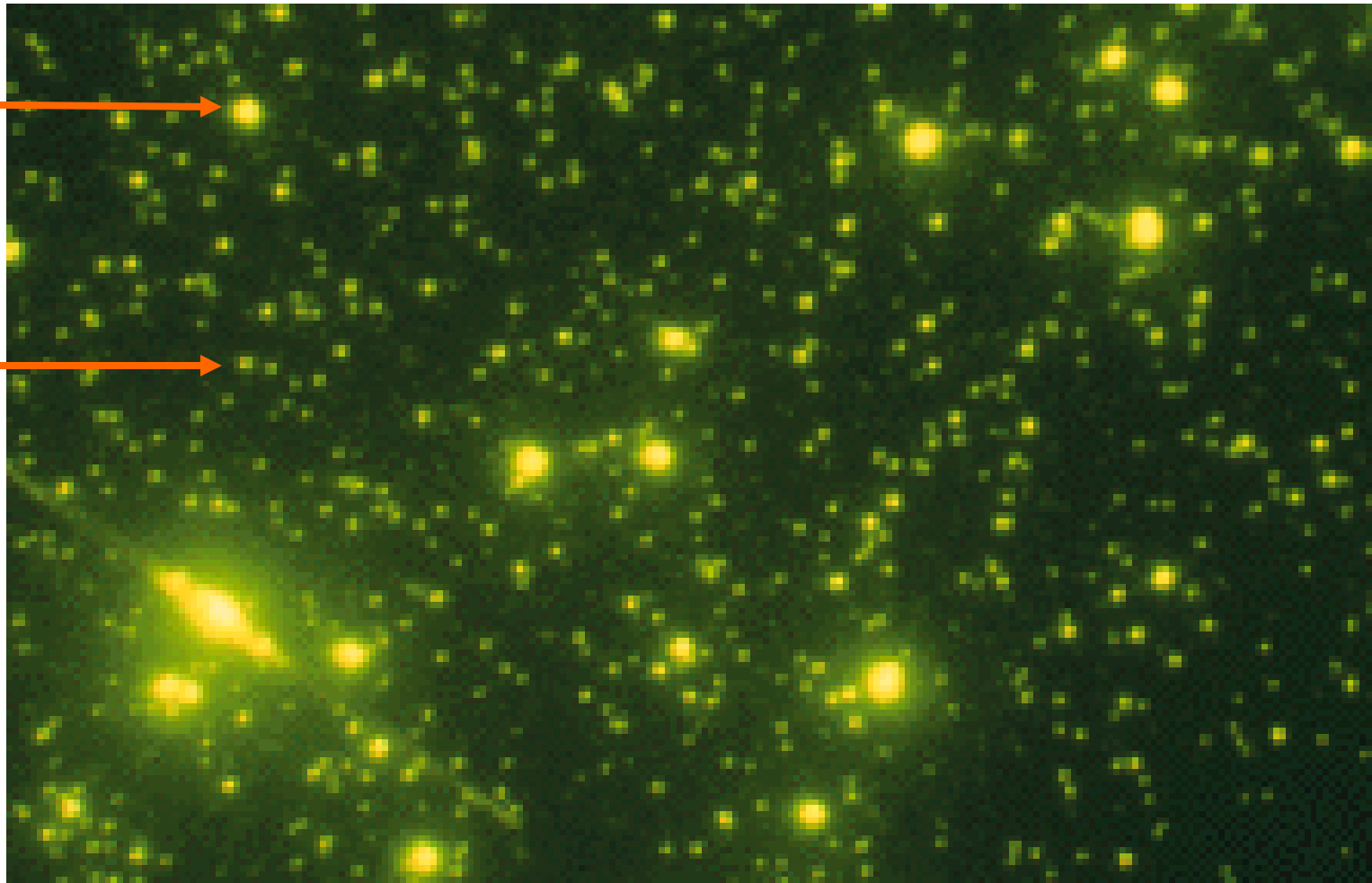
Sea water

Number of virus = number of bacteria x 10

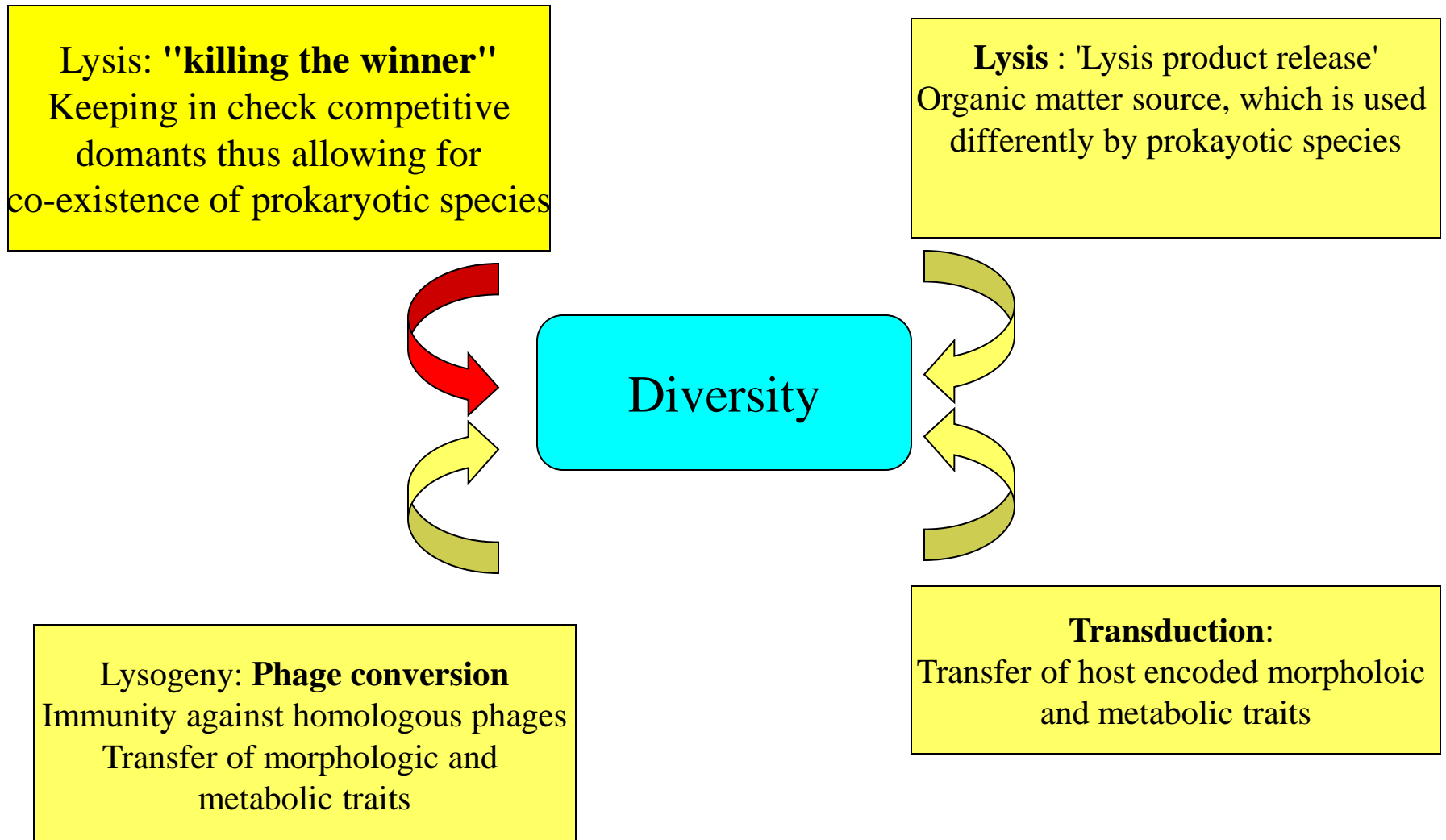
bactérie



virus

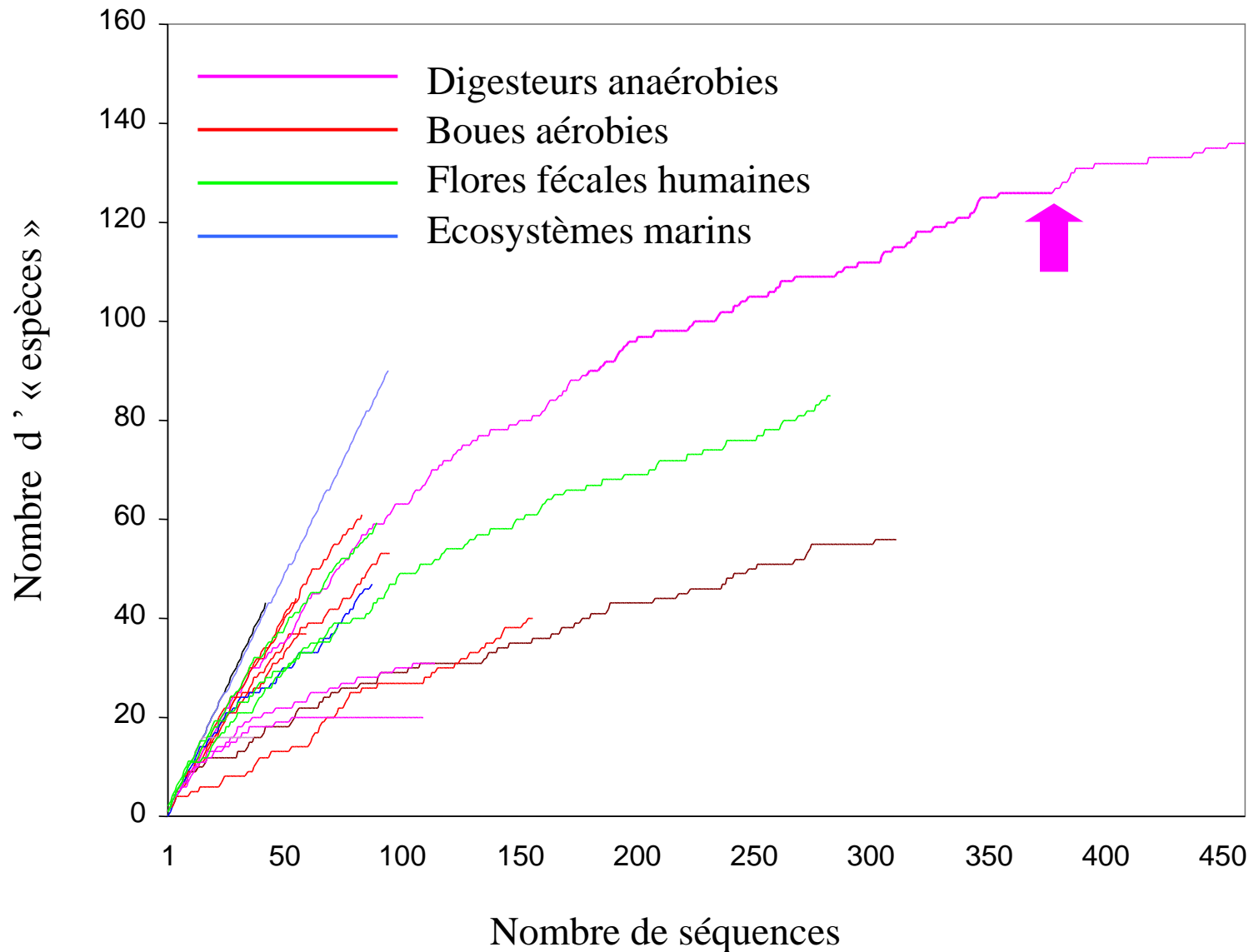


Potential effects of virus on prokaryotic diversity



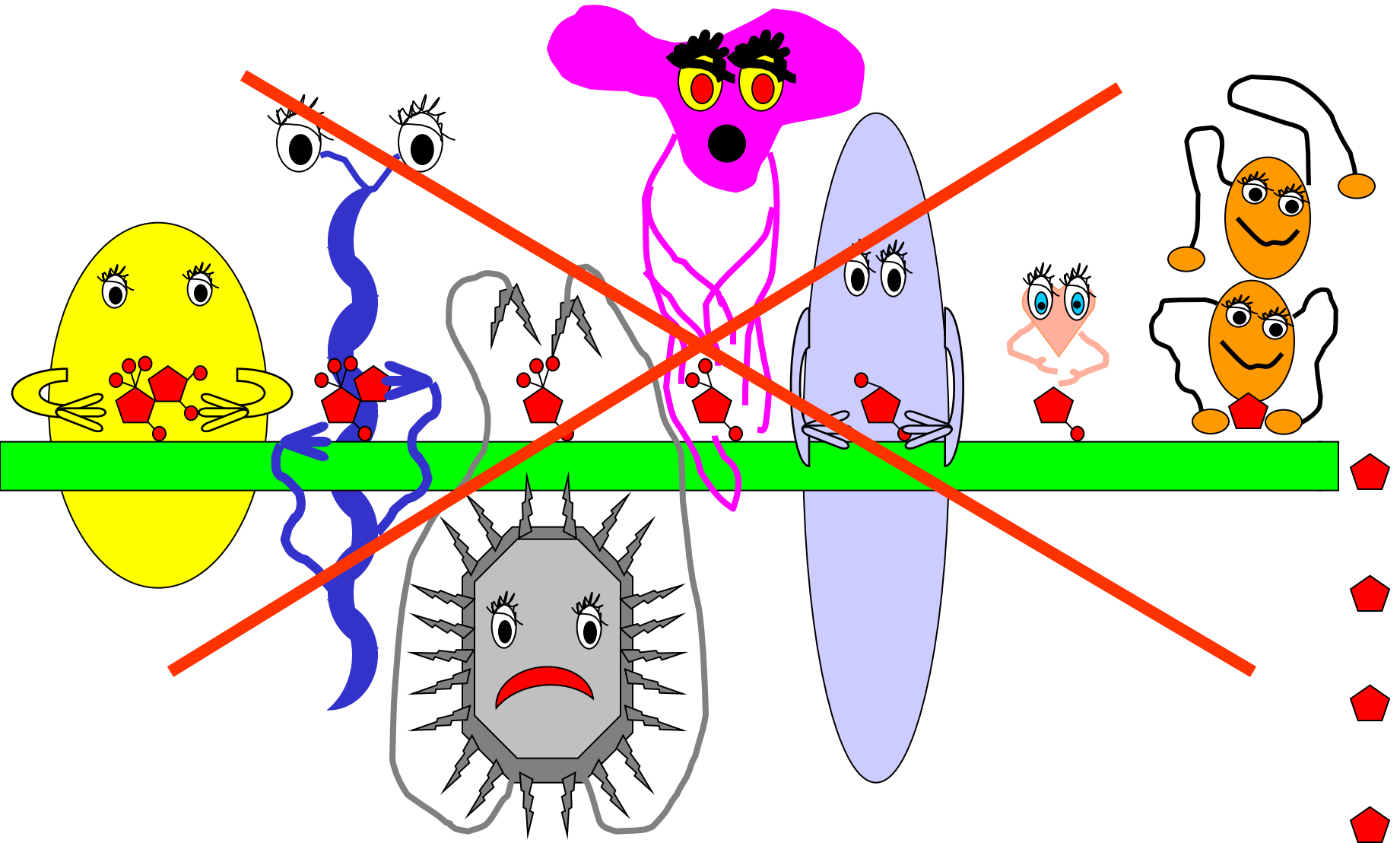
Inventaire total digesteur anaérobie

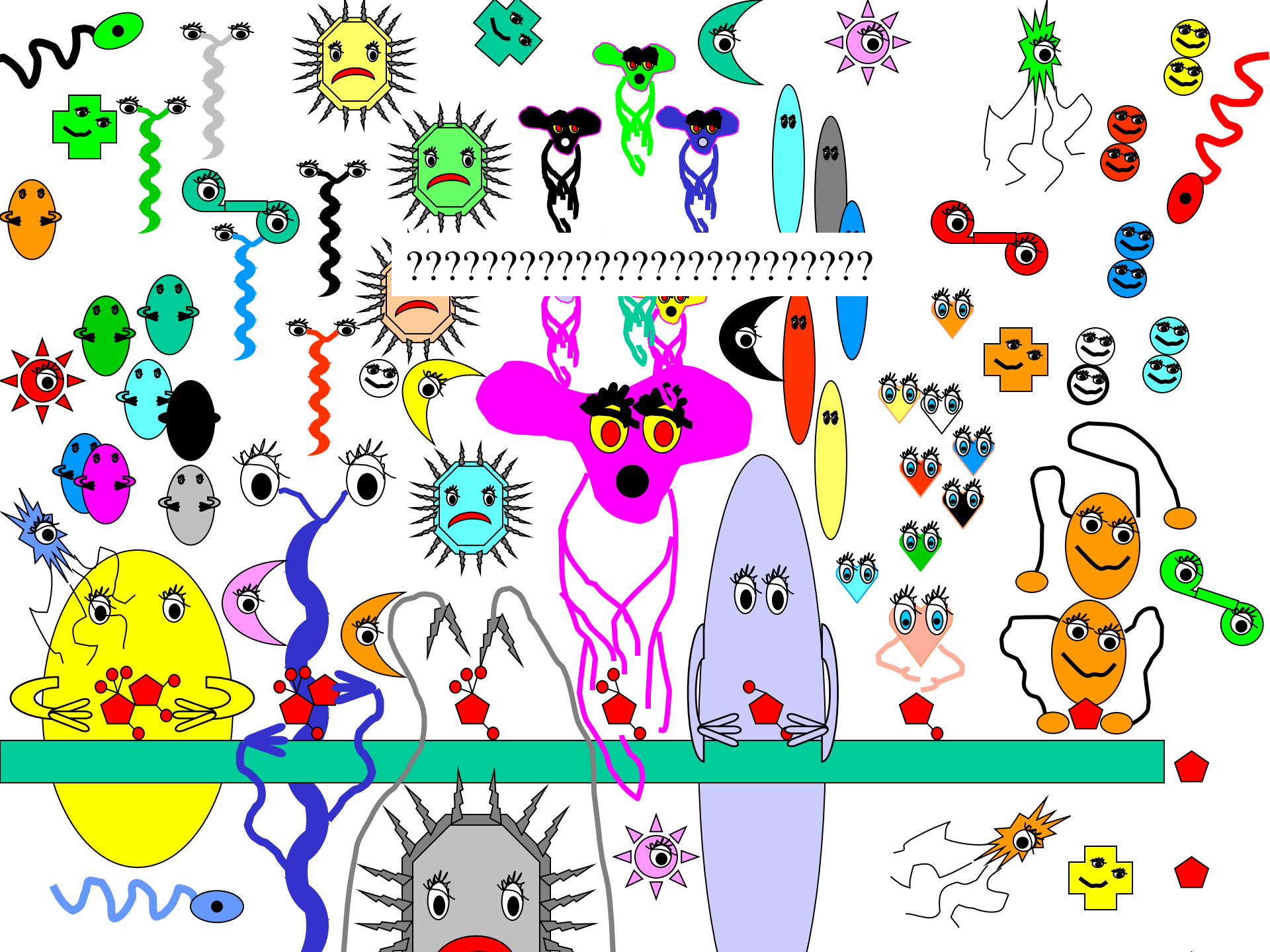
Courbe de raréfaction



Taylor like vision ?

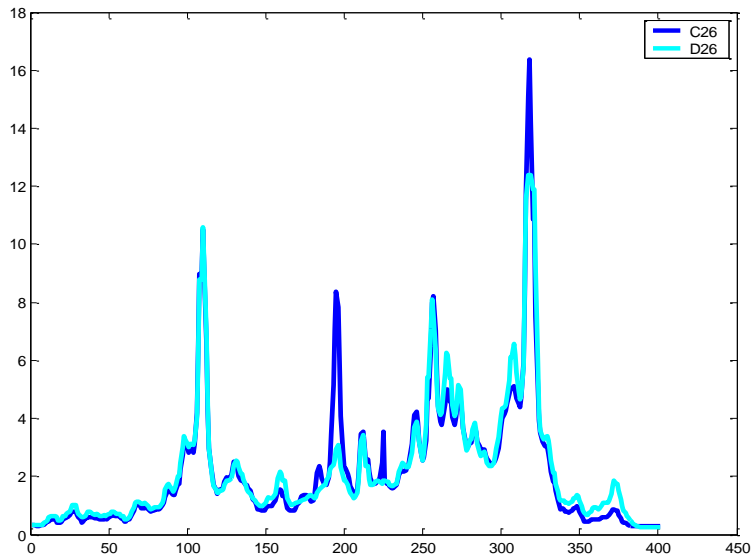
- Food web
- one species fill one ecological niche



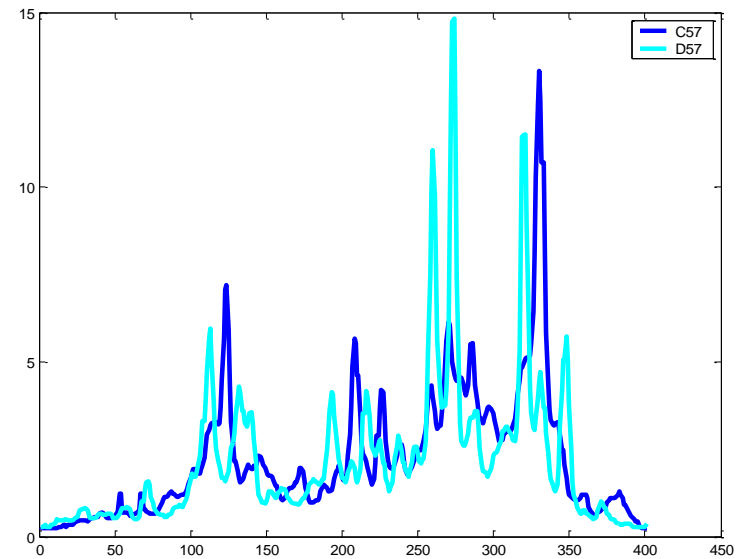


????????????????????????????????

Instability two twin anaerobic digesters 57 jours



Twin after 26 days

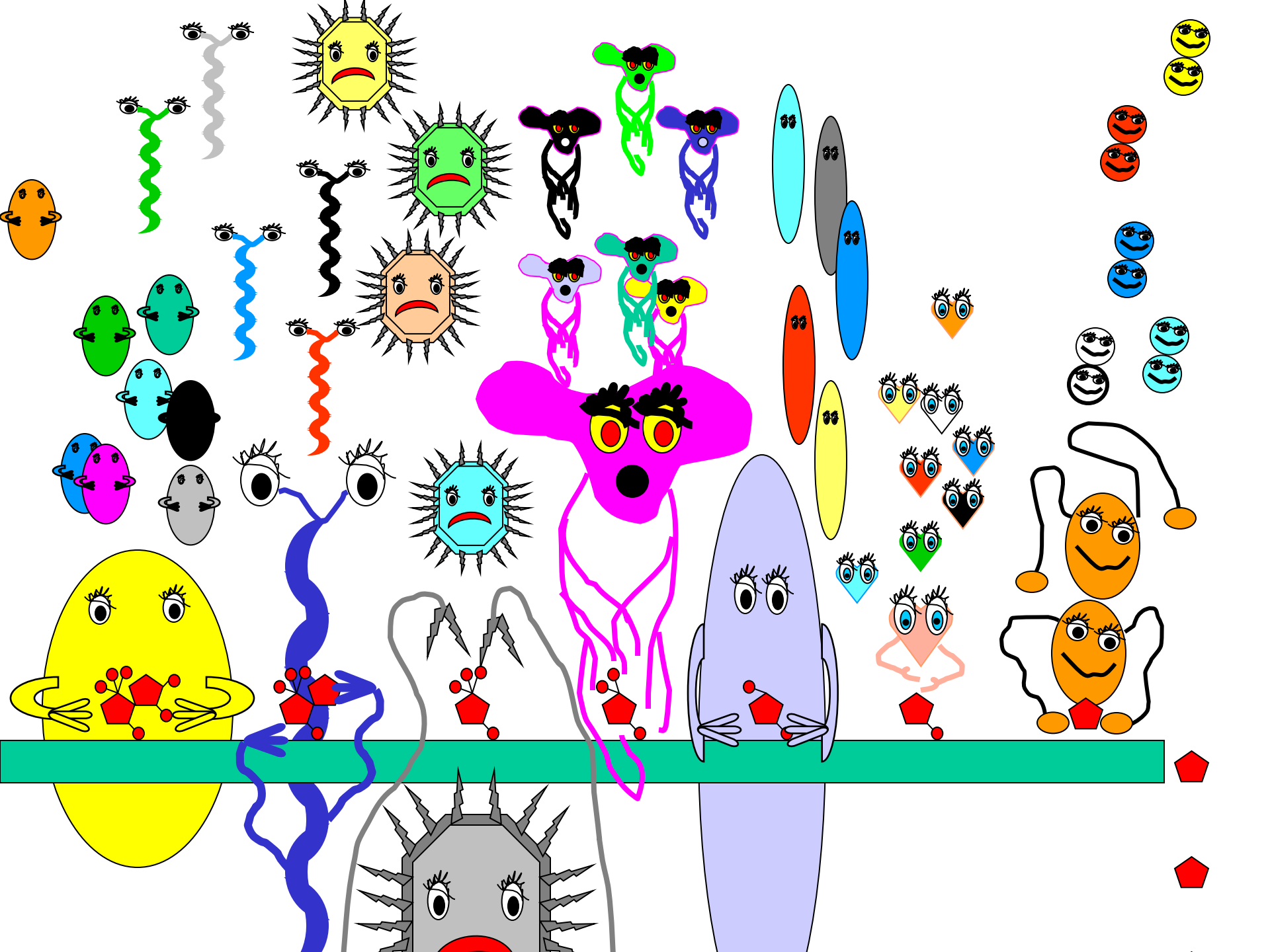


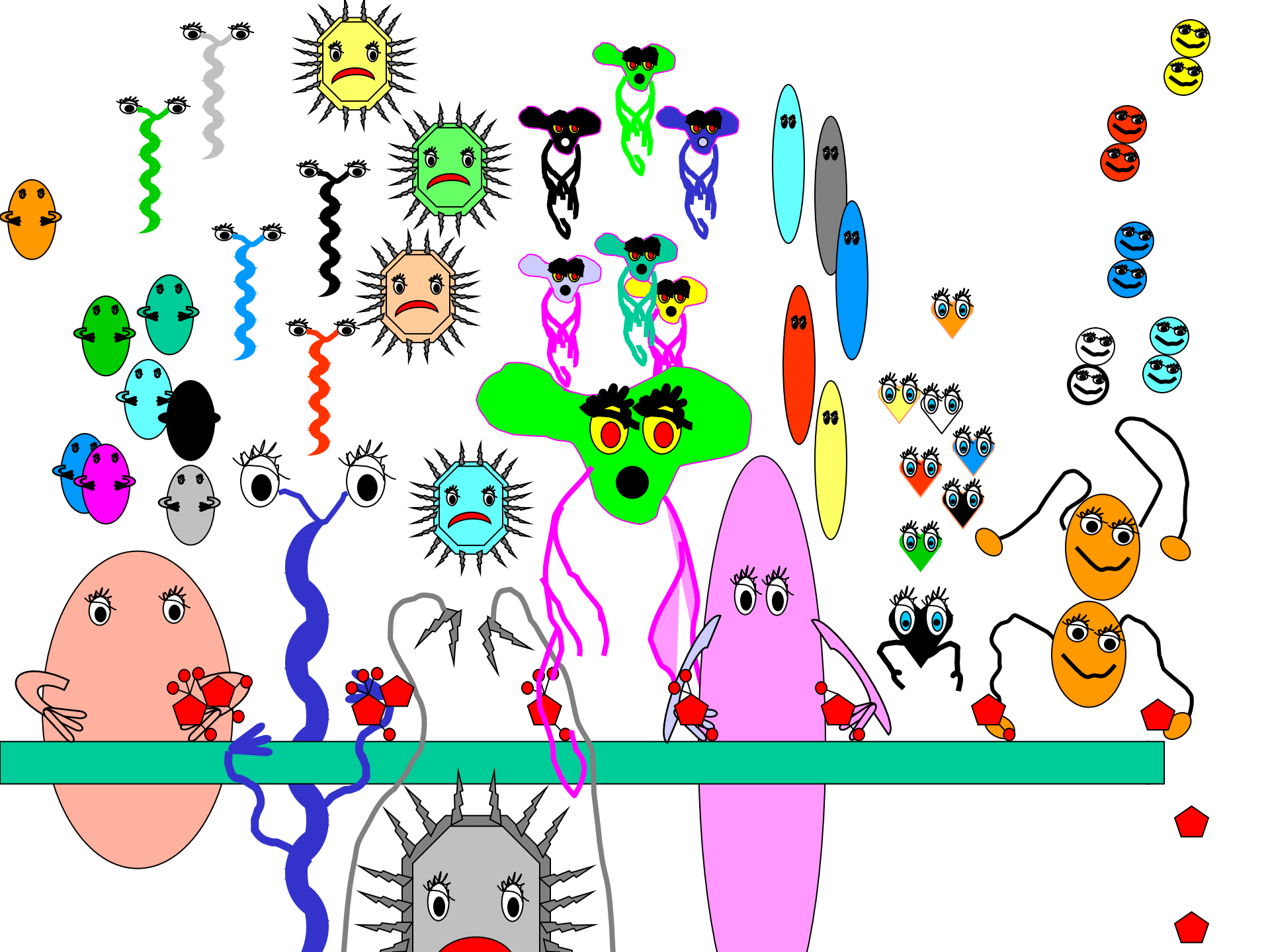
Twin after 57 days

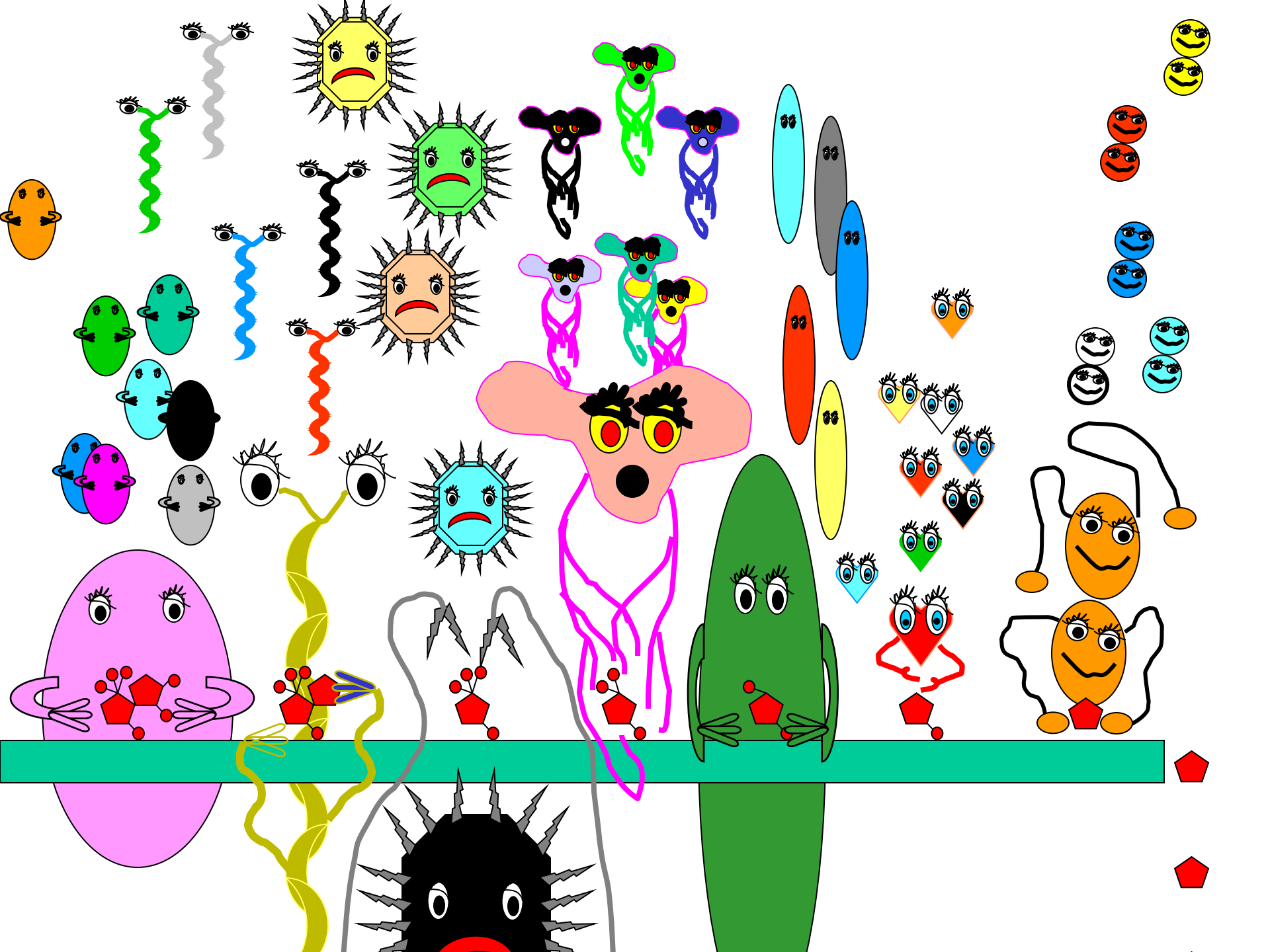
Same pictures

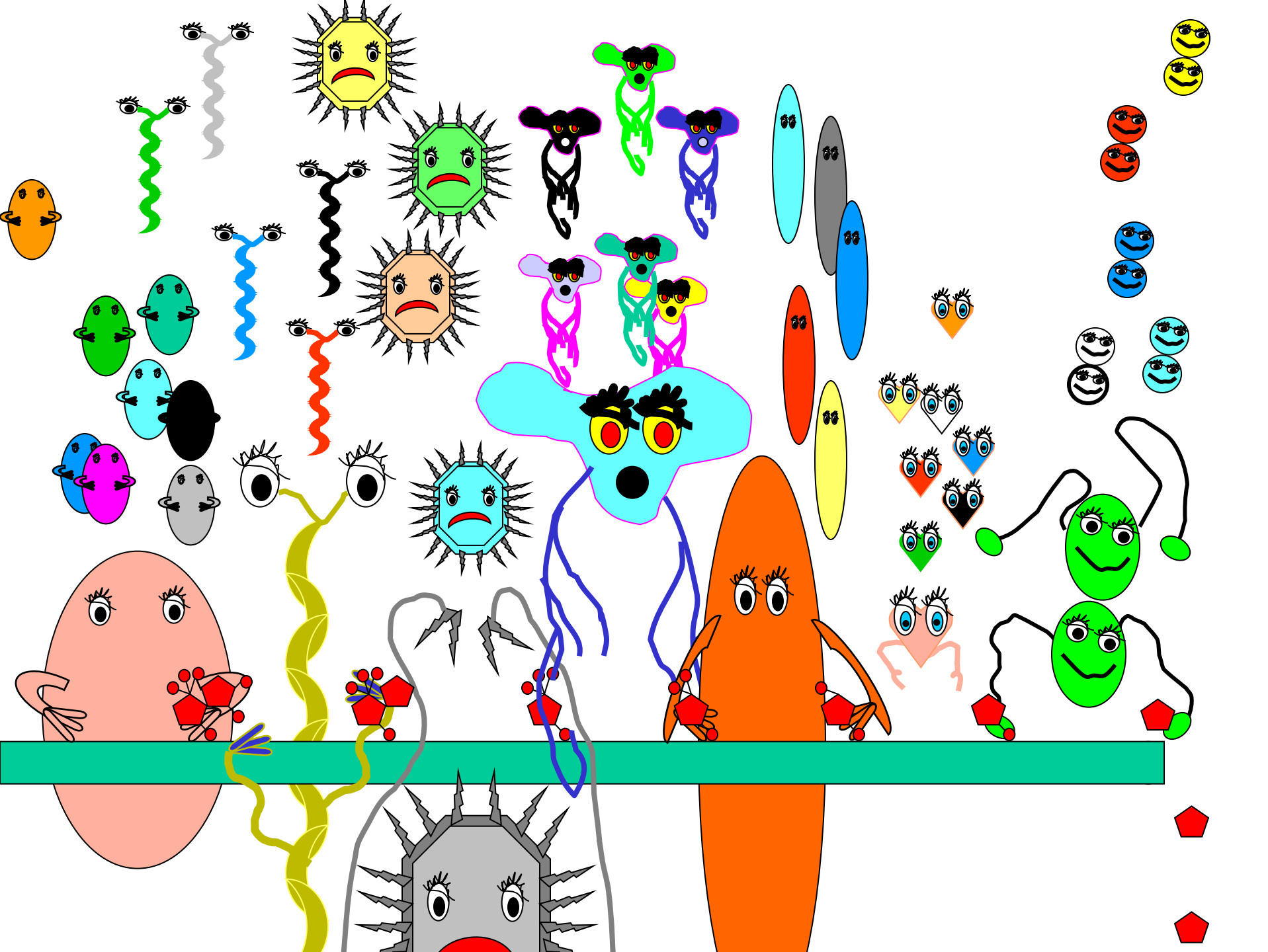
Giuseppe Arcimboldo (1527-1593)

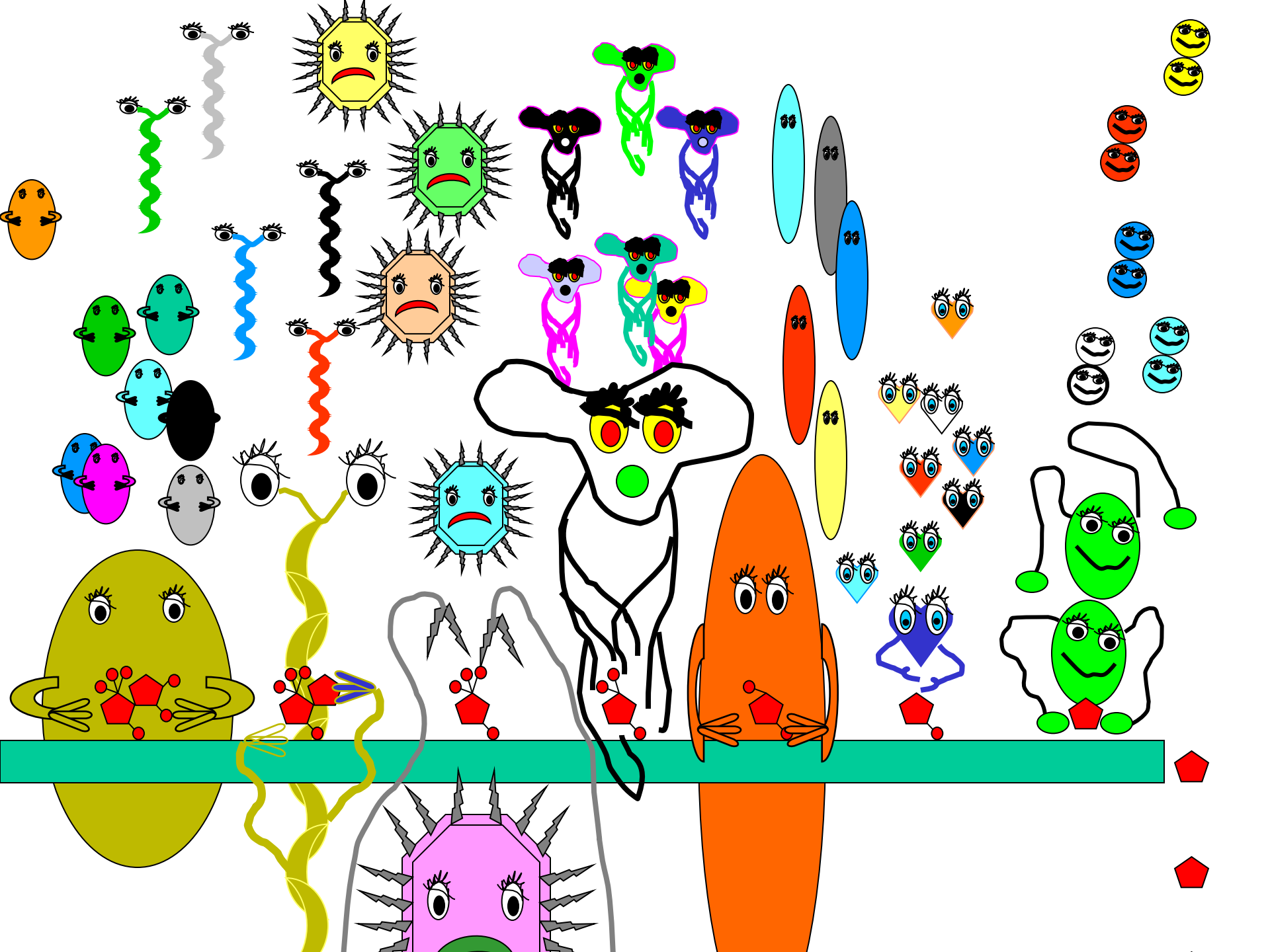


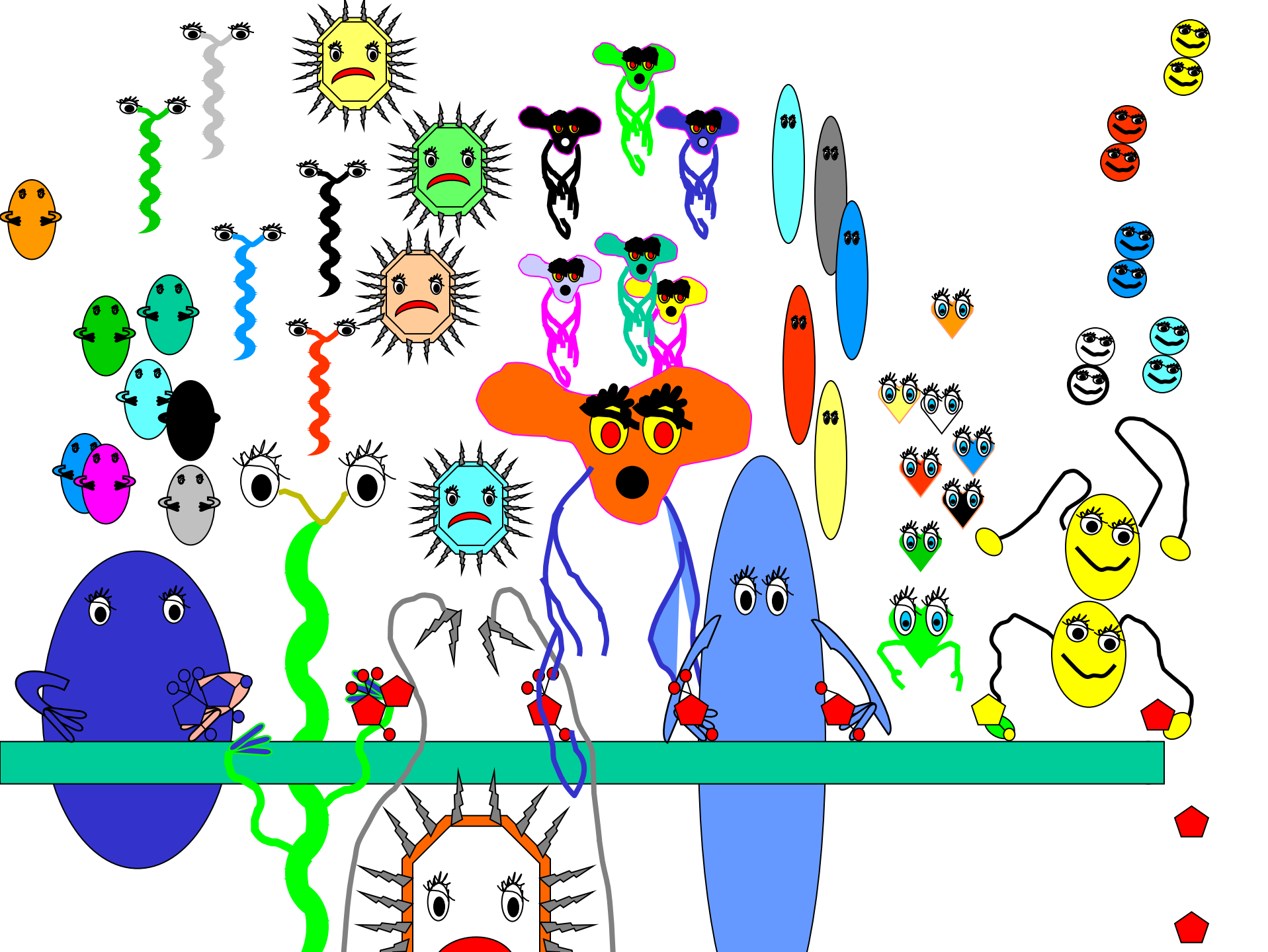


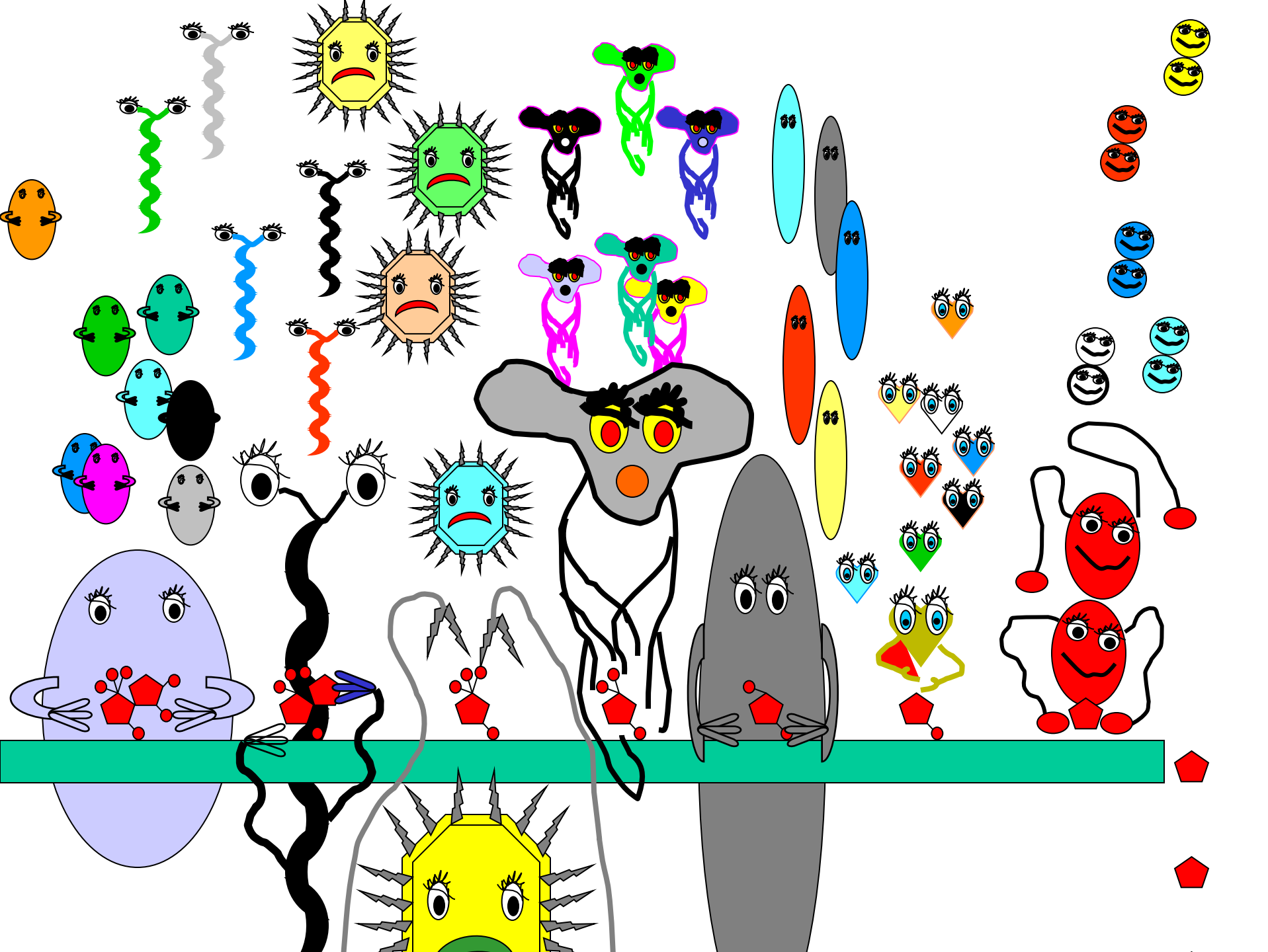


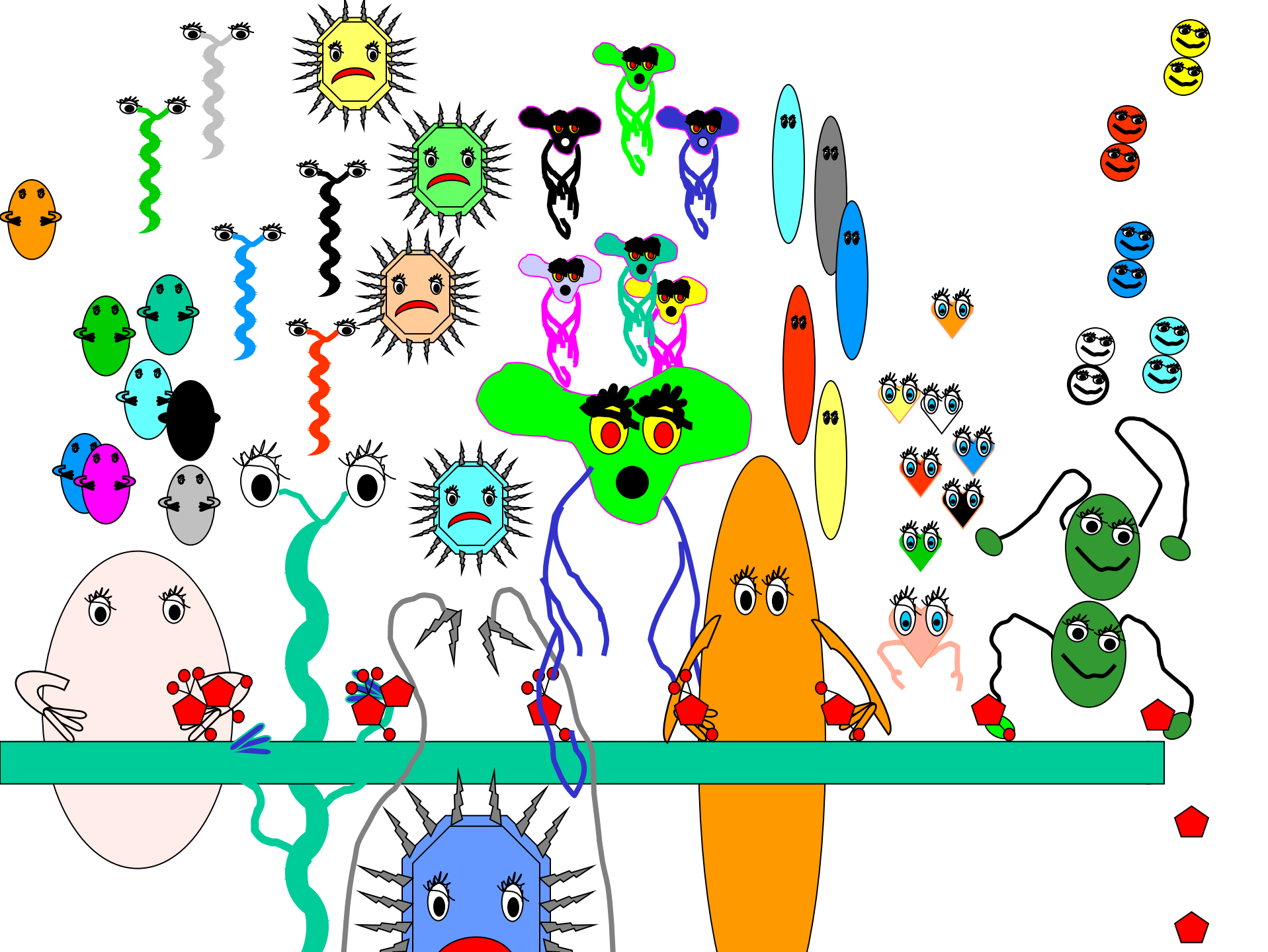






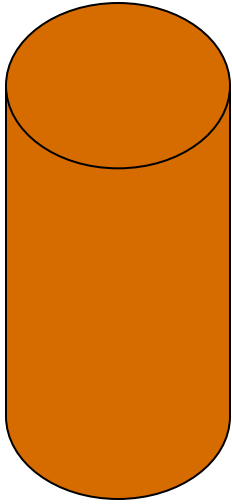






Quels outils?

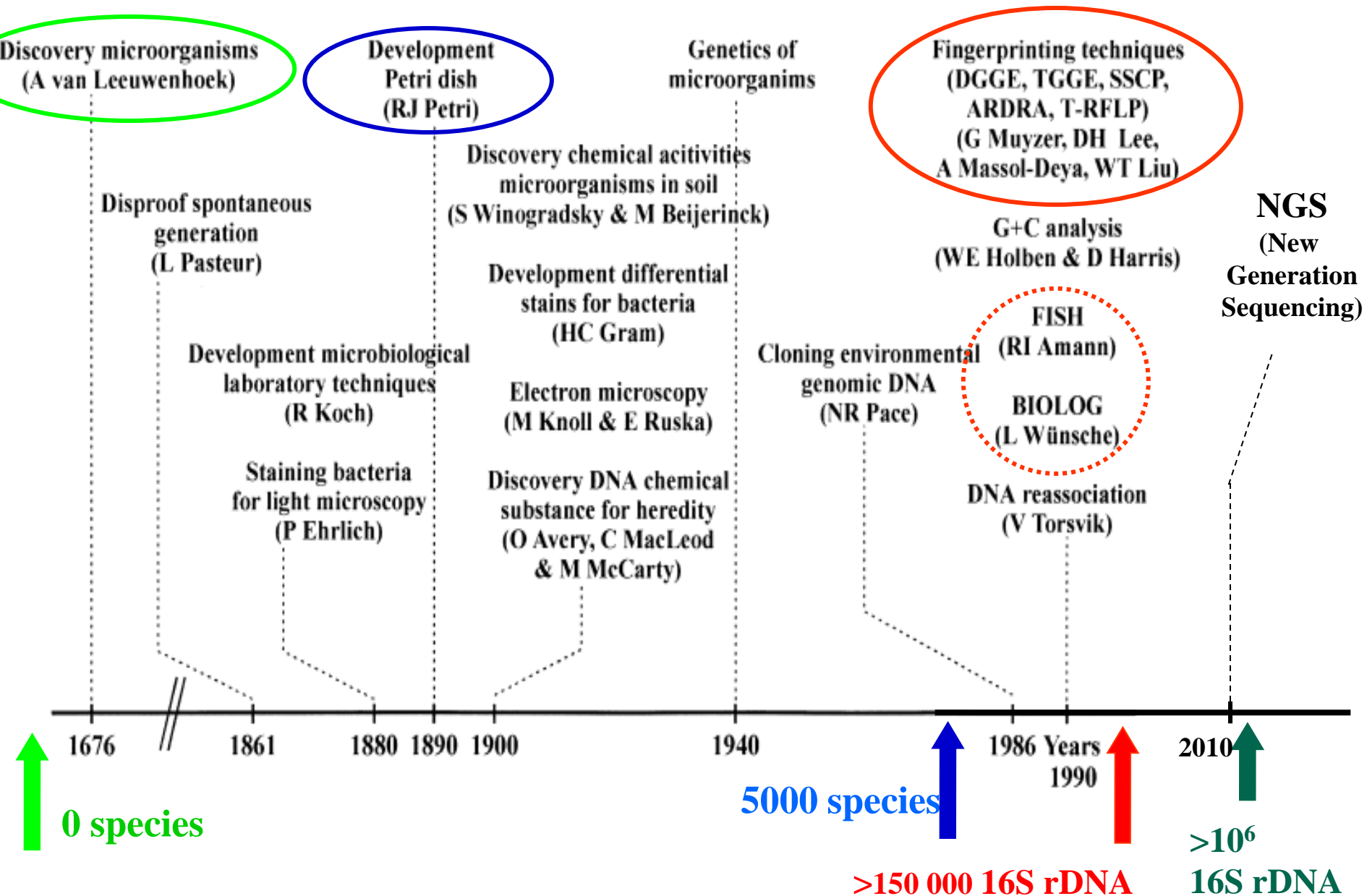
De Pasteur au NGS



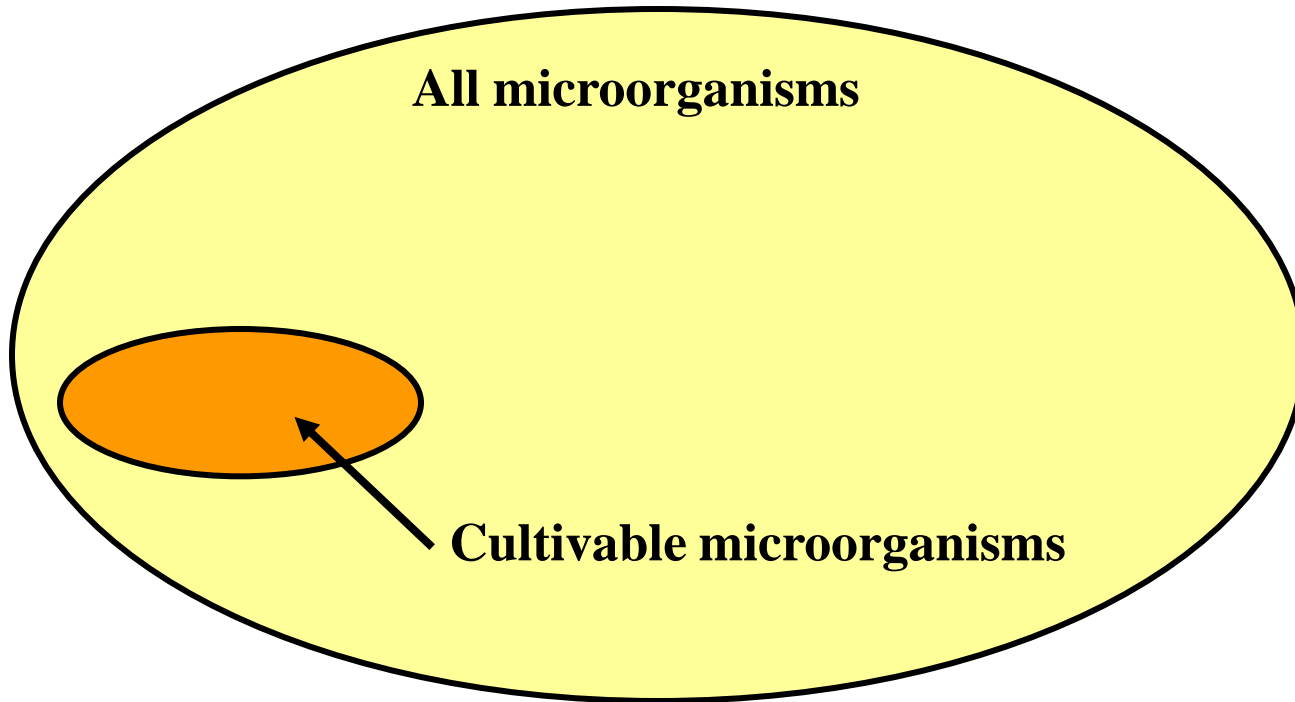
=



Petite histoire de la microbiologie

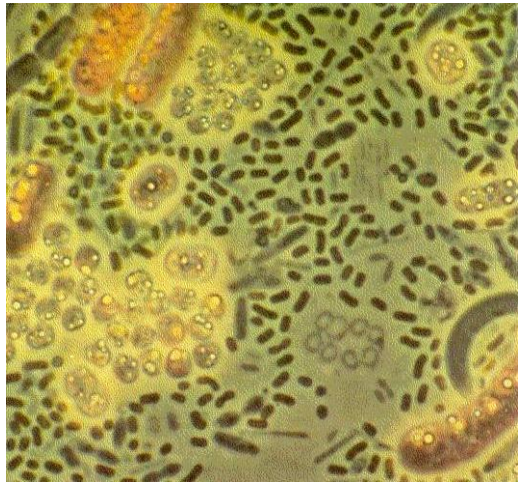


Picture from culture ?

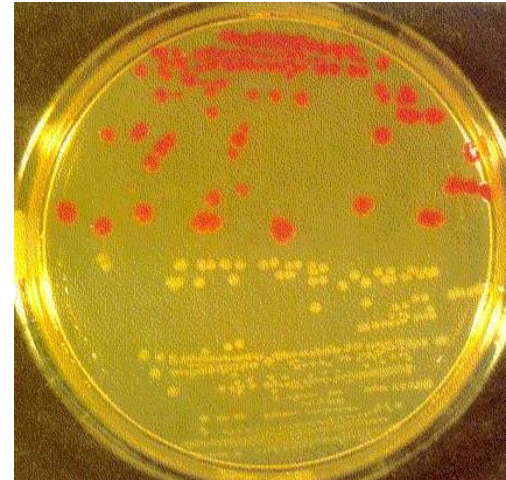


Les techniques classiques

Microscopie
(+/- colorations)



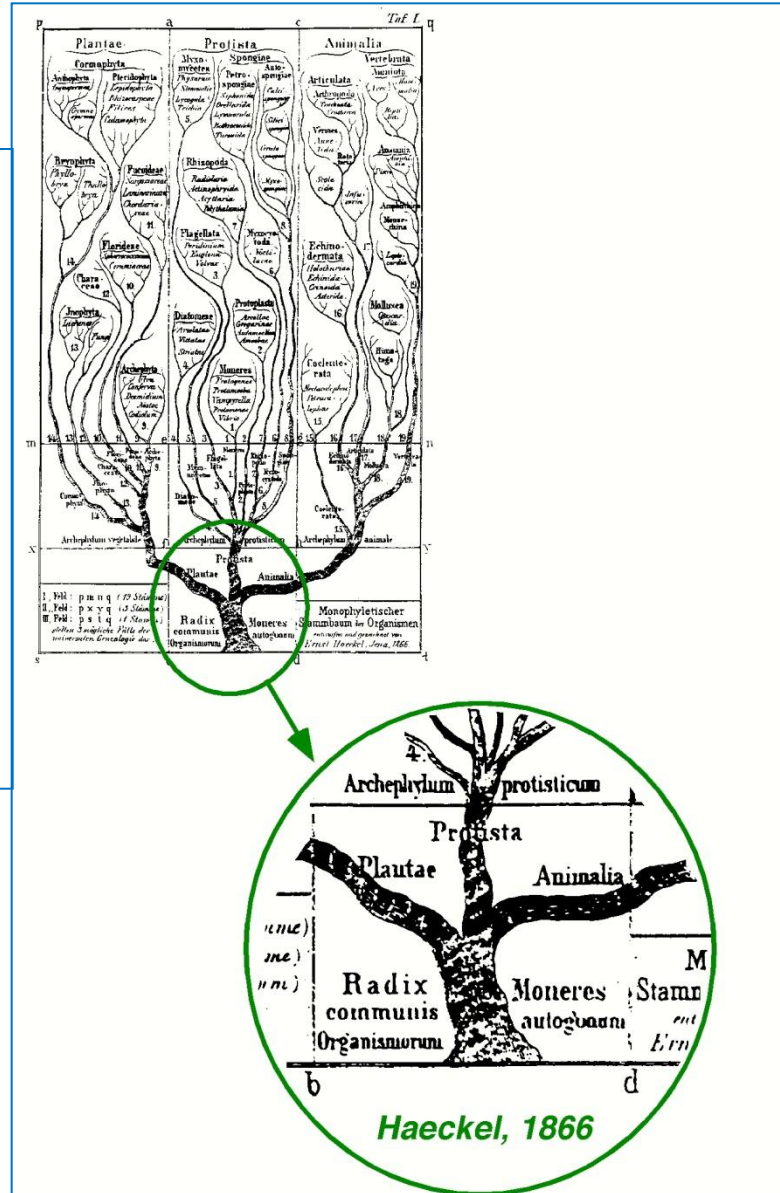
Isoler des souches
(Tests physiologiques)



Et leurs limitations ...

Le premier arbre

Van
Leeuwenhoek
~1700
Microscopie
&
Protistes



Haeckel 1866

Plantes
Protistes
Animaux

Diversité Microbienne

(Amann et al., Microbiol. Rev., 1995)

| <u>Habitat</u> | <u>Cultivabilité (%)</u> |
|-----------------------|--------------------------|
| <i>océans</i> | <i>0.001-0.1</i> |
| <i>eau douce</i> | <i>0.25</i> |
| <i>Sédiments</i> | <i>0.25</i> |
| <i>Sol</i> | <i>0.3</i> |
| <i>Boues activées</i> | <i>1-15</i> |

“ Many (most ?) of our impressions after microbiology’s first century, dominated as it was by the necessity of cultivating micro-organisms, are based on what could be considered to be observations of rare species maintained in zoos ”.

Petite histoire de la microbiologie

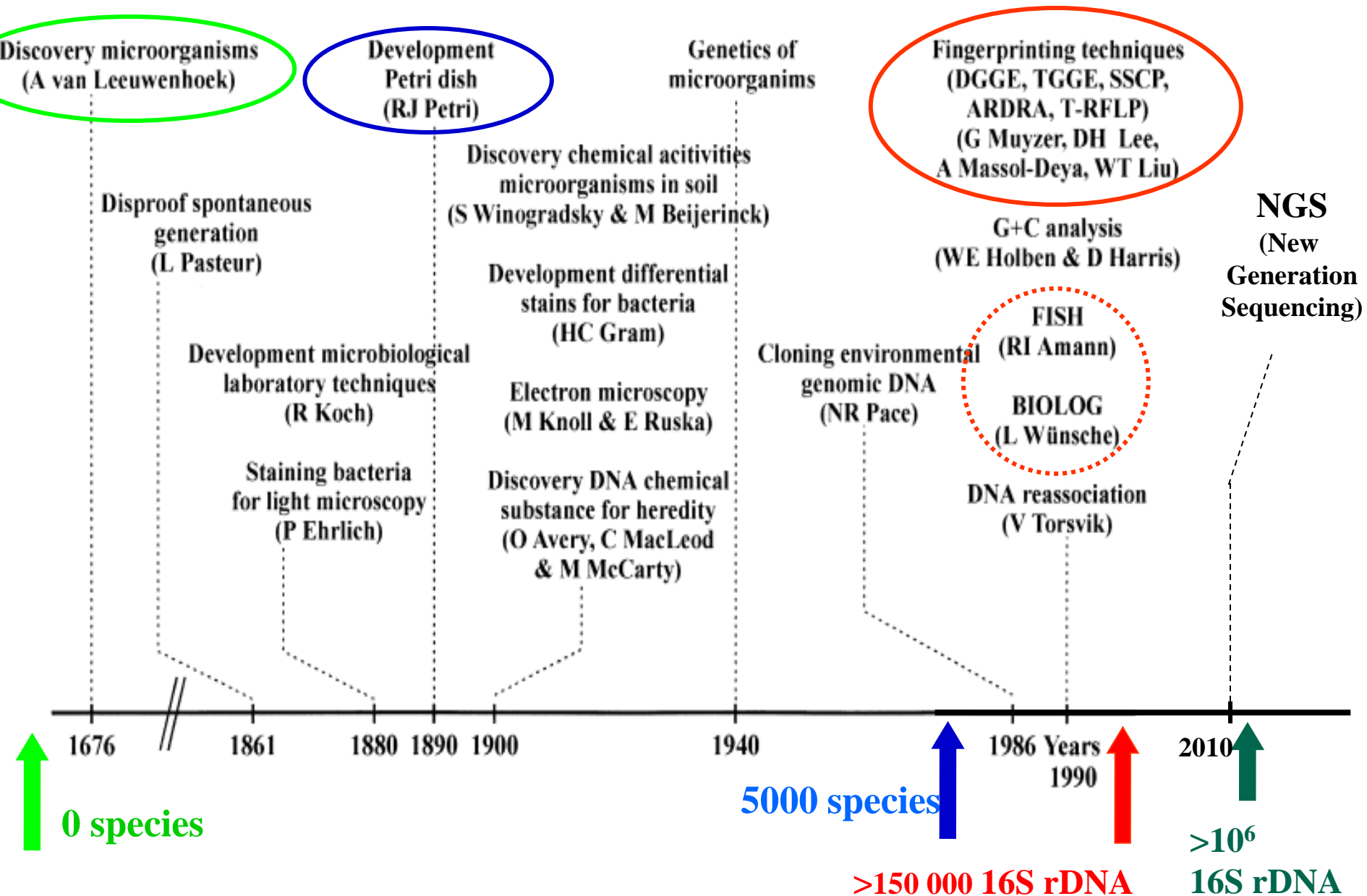
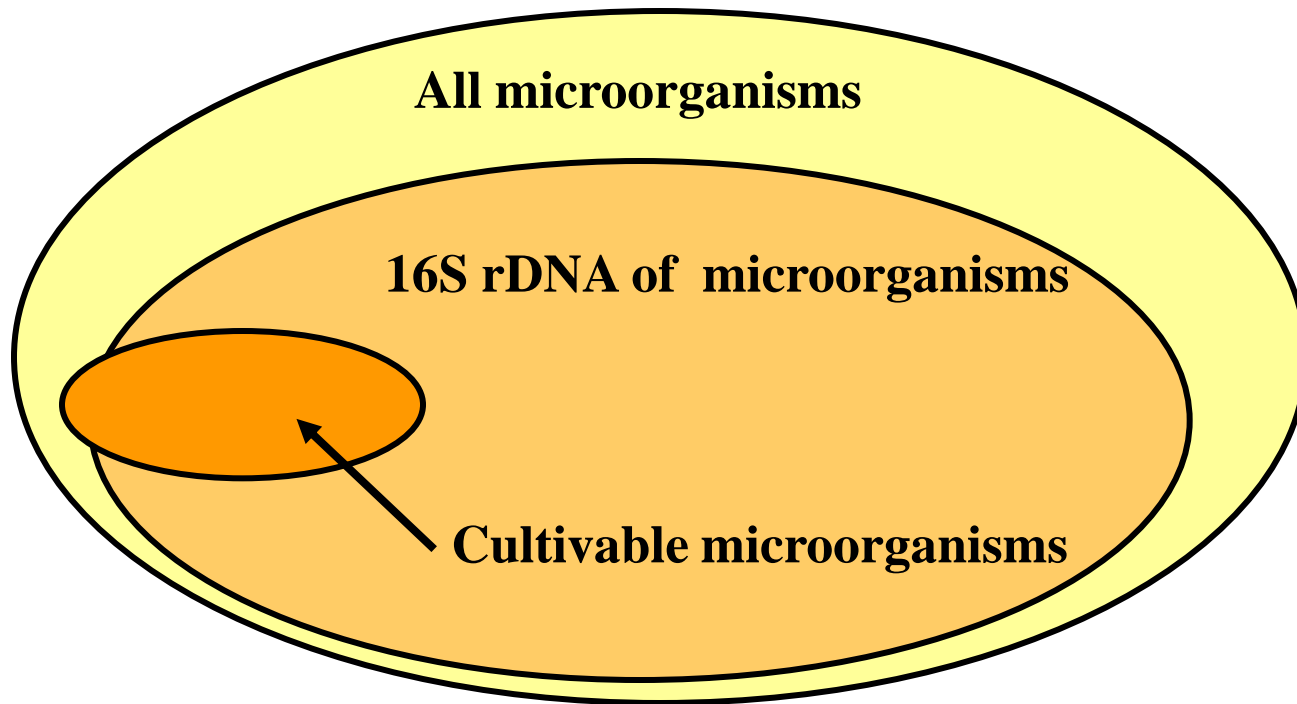


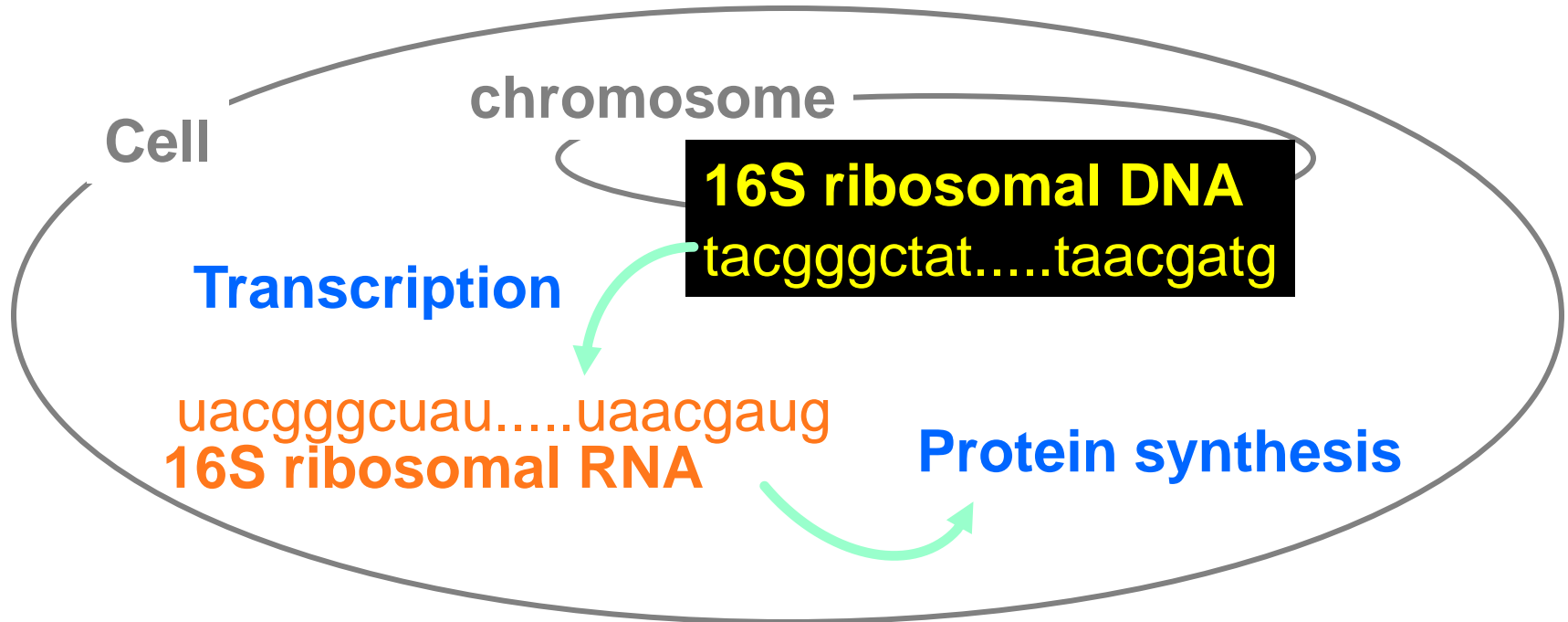
Image avec les outils moléculaires ?



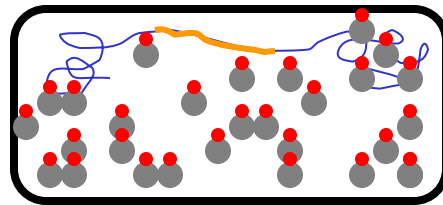
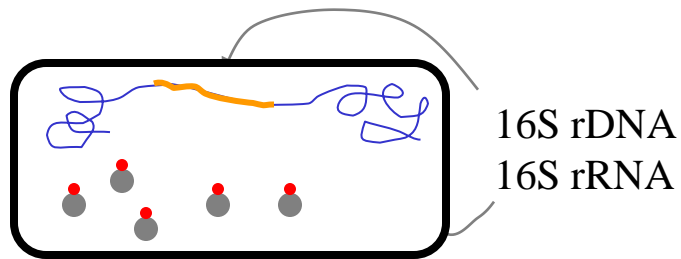
Nouveaux outils = nouvelle vision

Outils de description et d'observation

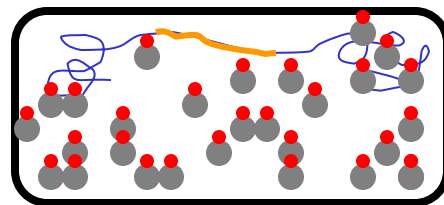
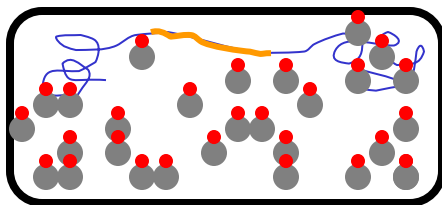
The 16s Ribosomal DNA and Its Role



- ⇒ The 16S rDNA is a highly conserved gene.
- ⇒ Its sequence is specific for each species.
- The level of 16S ribosomal RNA is correlated with the metabolic activity of the cell.



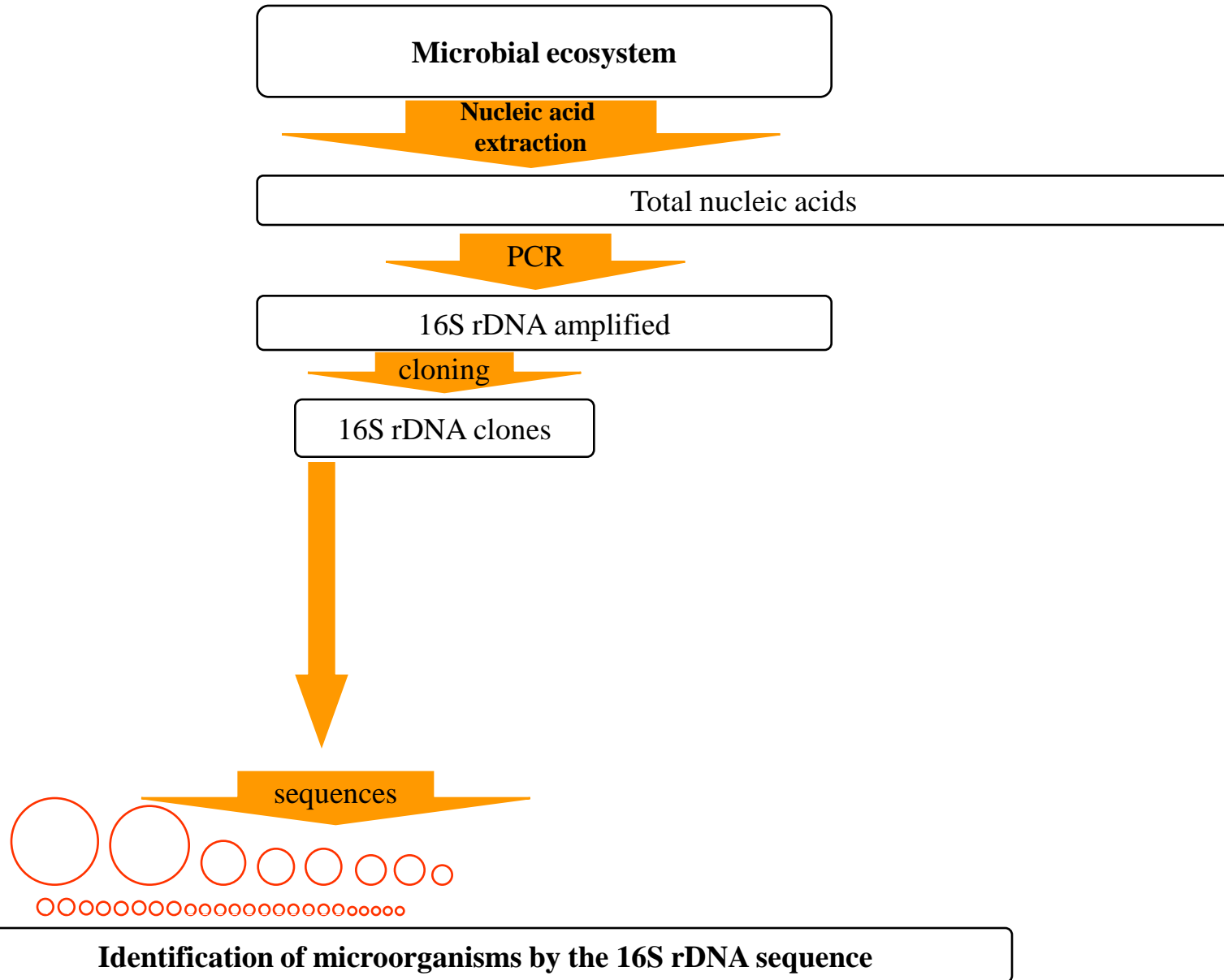
Favorable Conditions : 1st response



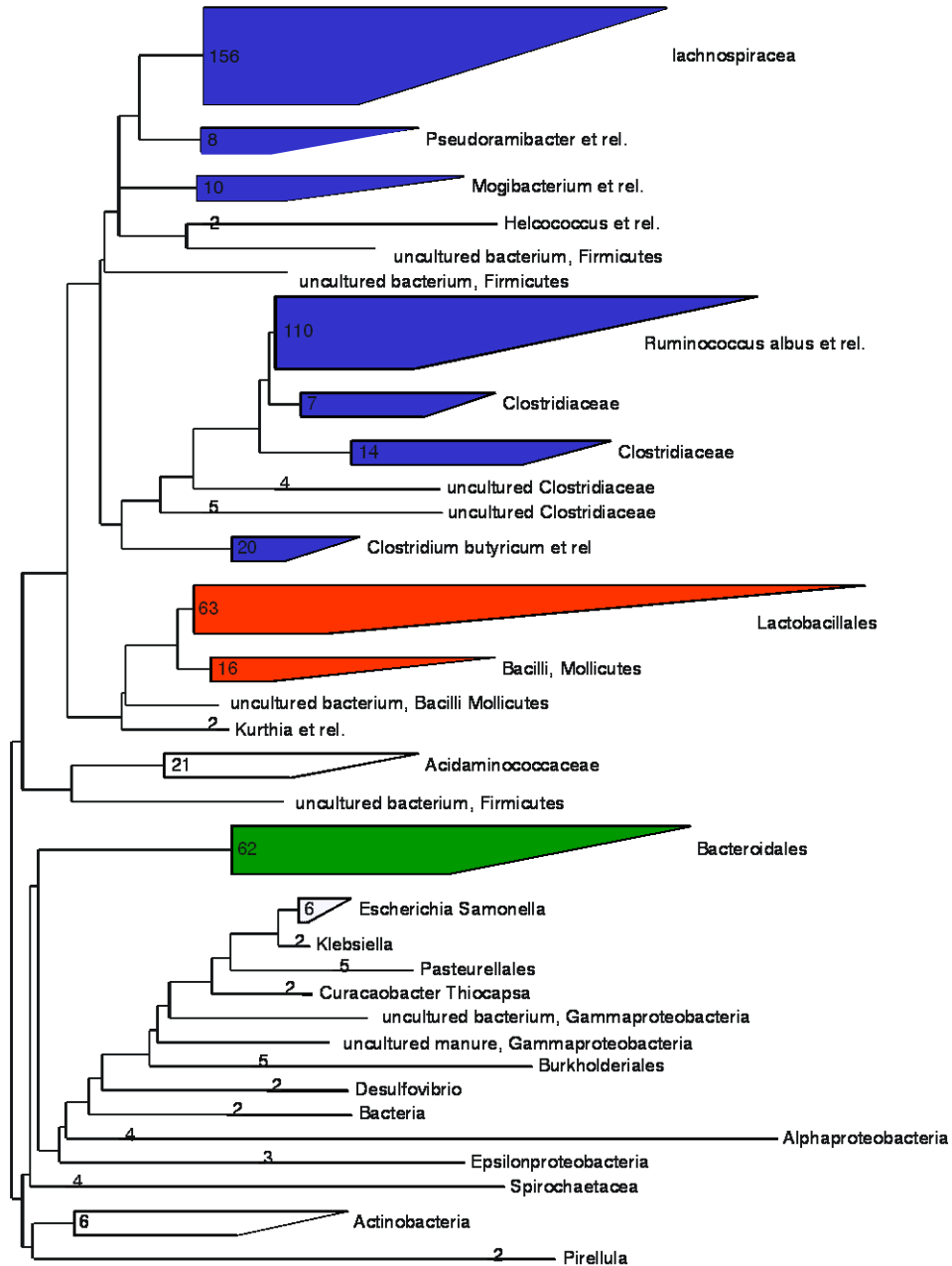
Favorable Conditions : 2nd response

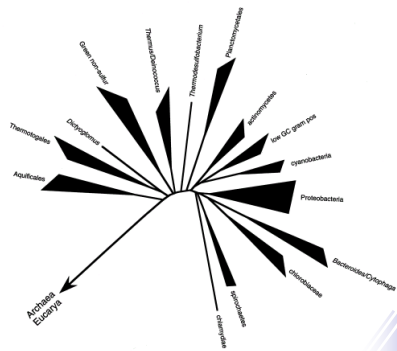
Postulat : 16S rDNA presence, 16S rRNA activity of microorganisms

Molecular tools box :molecular inventory

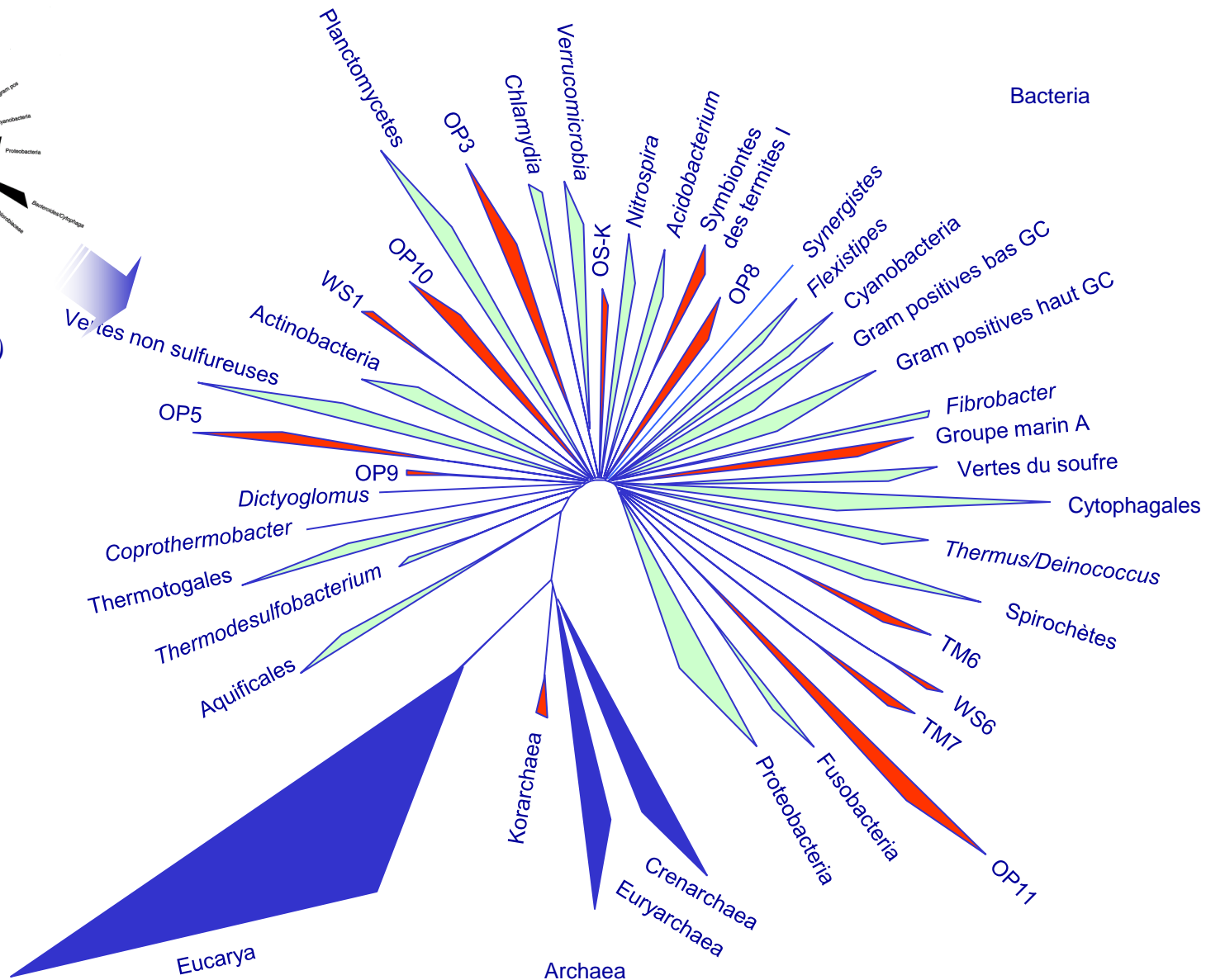


Arbres phylogénétiques



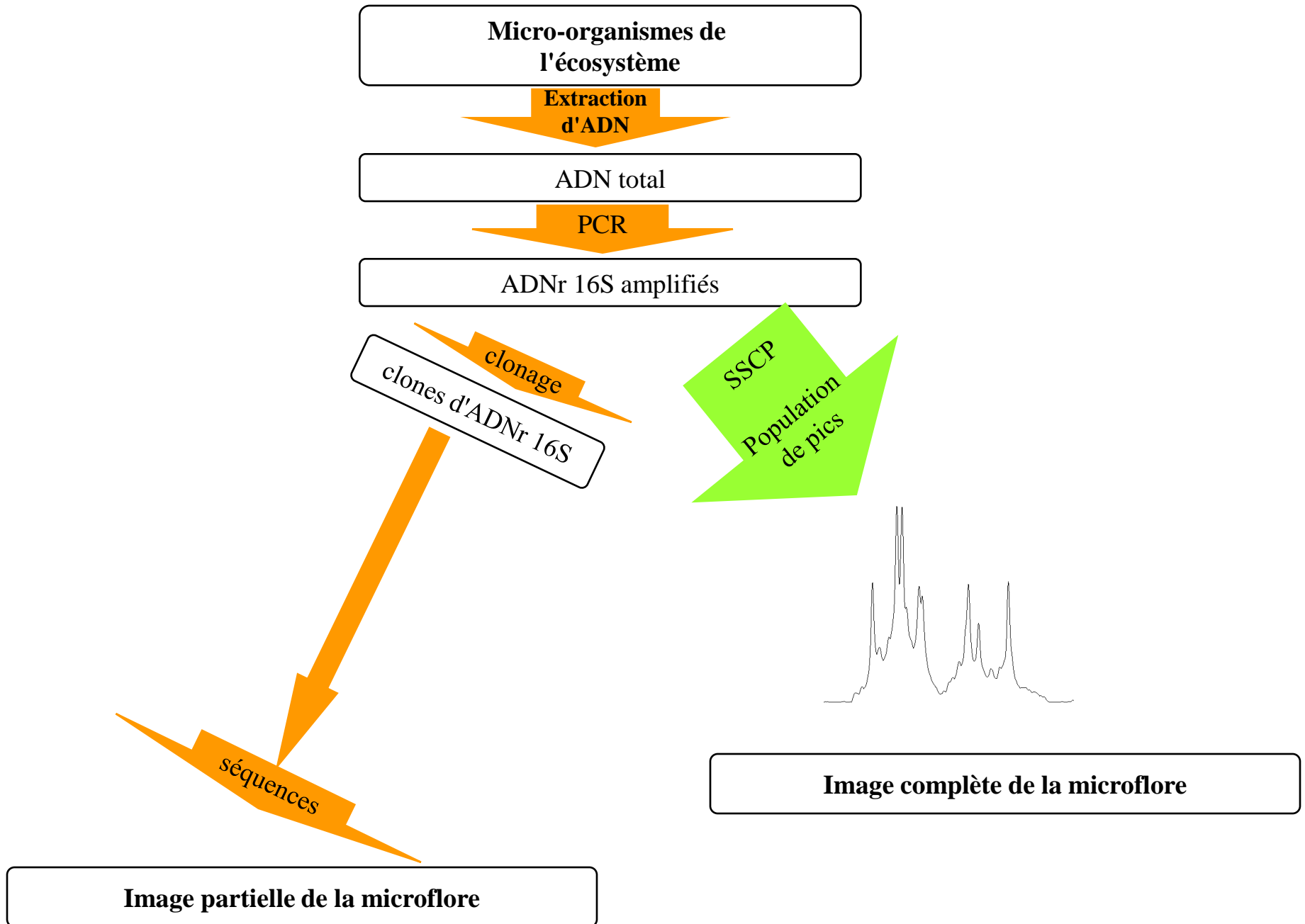


(1987 - 1990)
~15 lineages

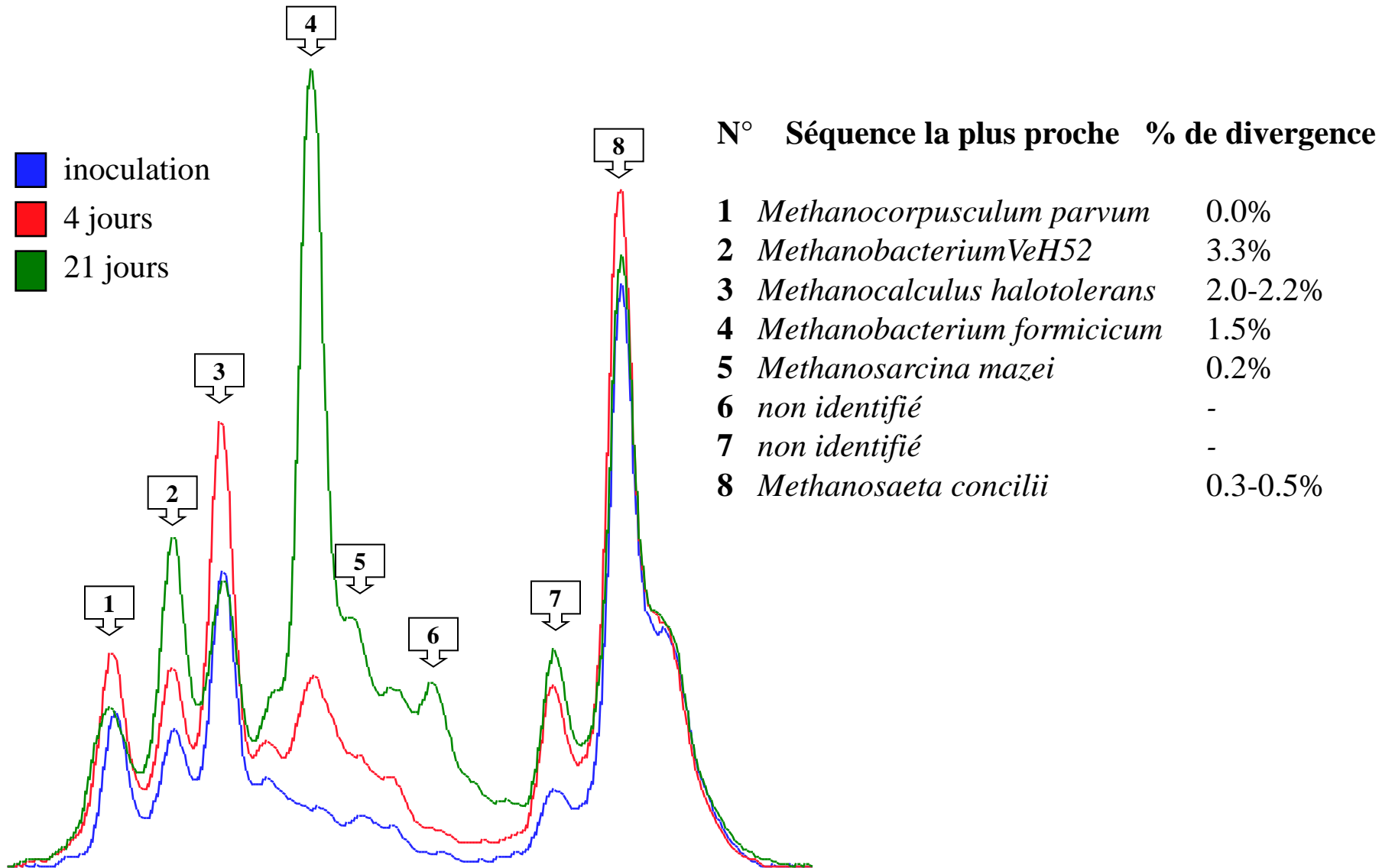


(2003, ~55 lineages)

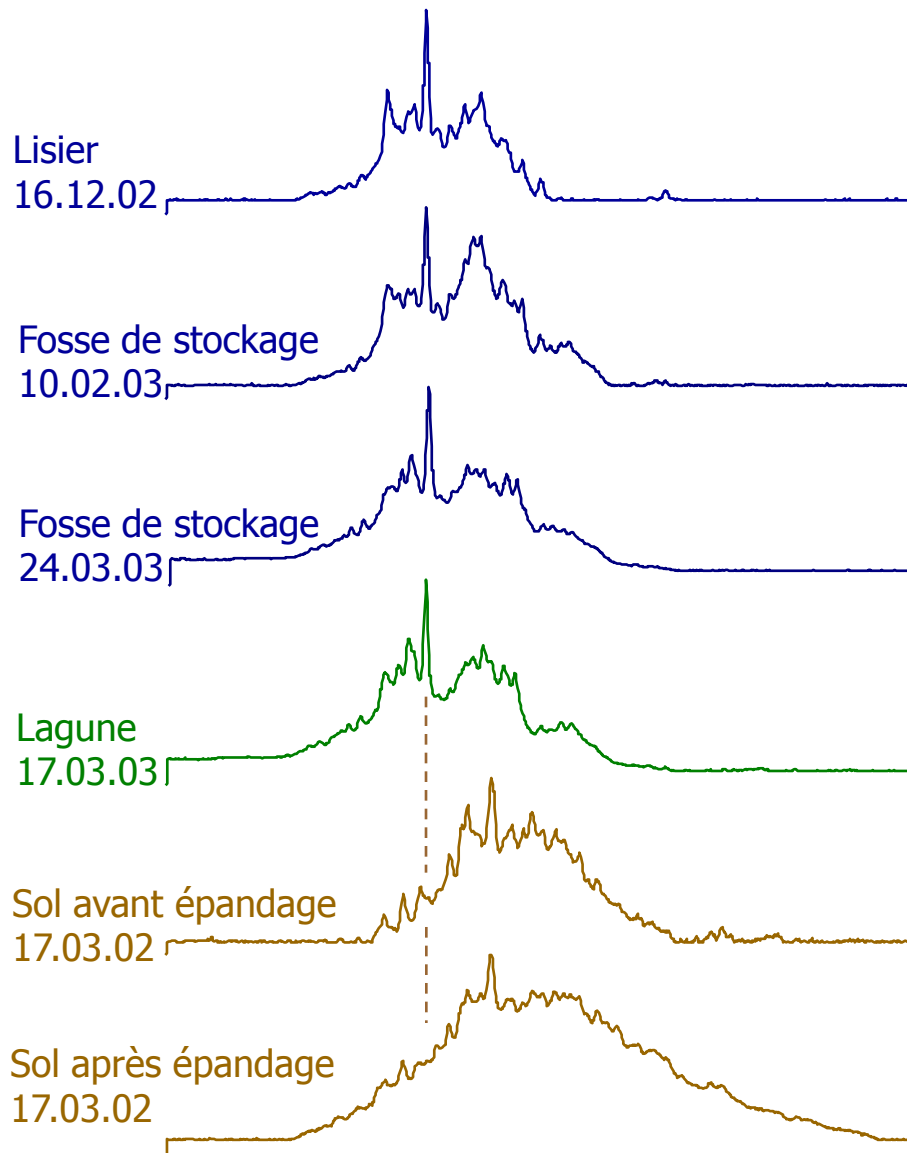
Techniques moléculaires sans connaissances préalables



Dynamique et identification de la communauté archaea à partir de l'inoculation du digesteur.(1)



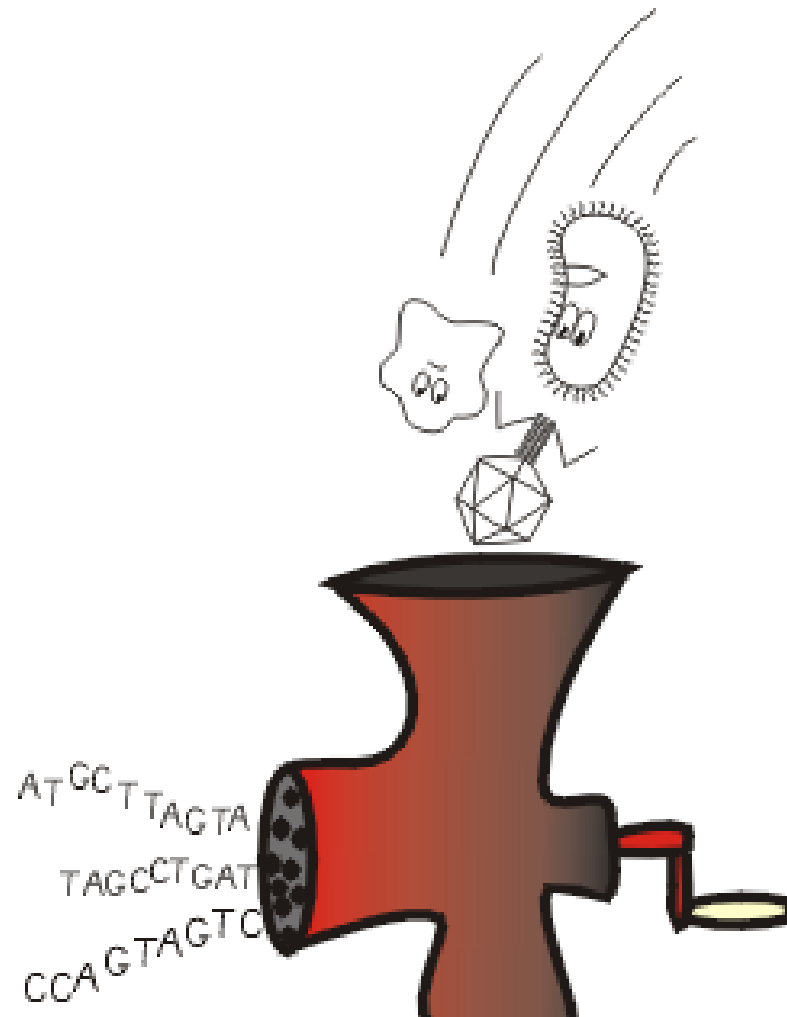
Exemple: lisier de porc

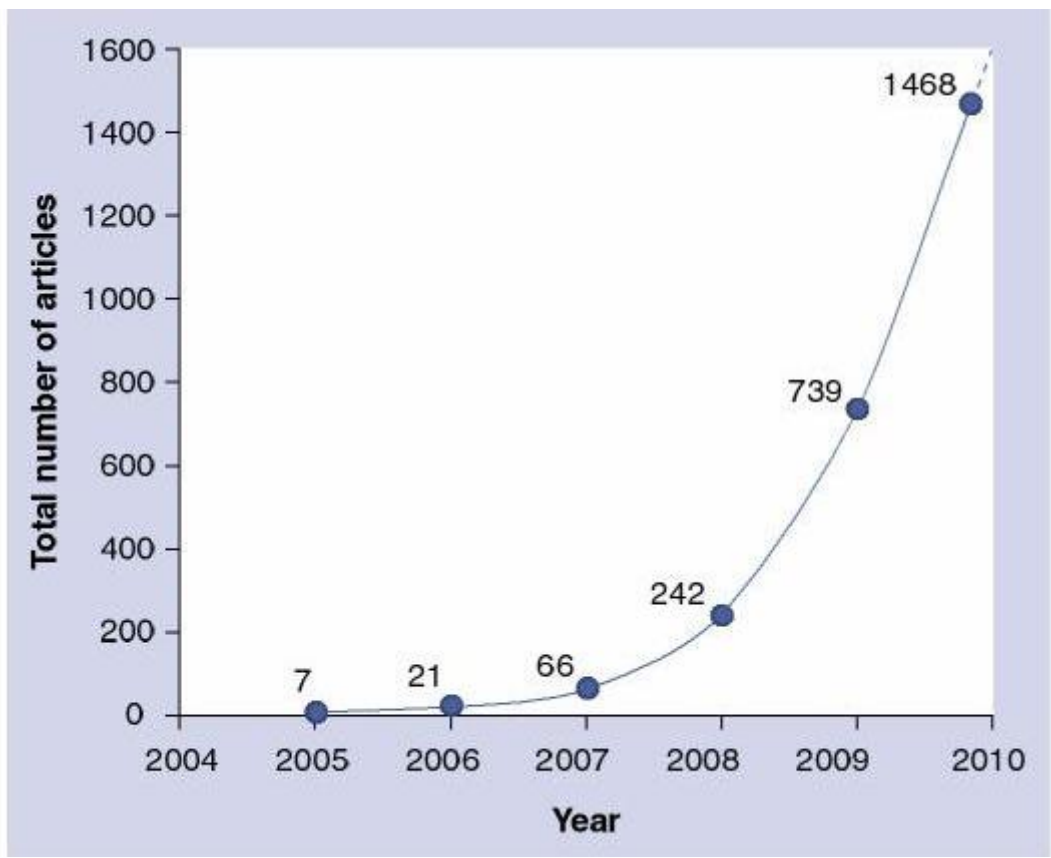


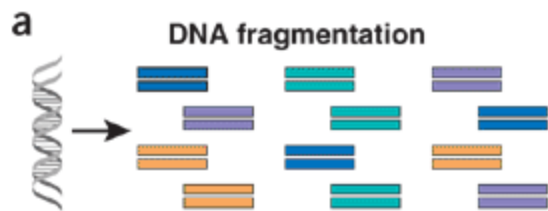
**Très peu d'évolution
au cours du stockage**

**Dans le sol > dilution
Pas de réels dominants
différences liées à l'échantillonnage**

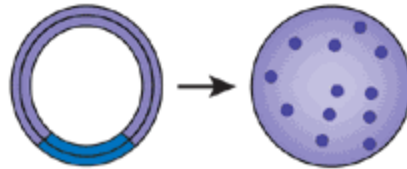
New generation sequencing principle



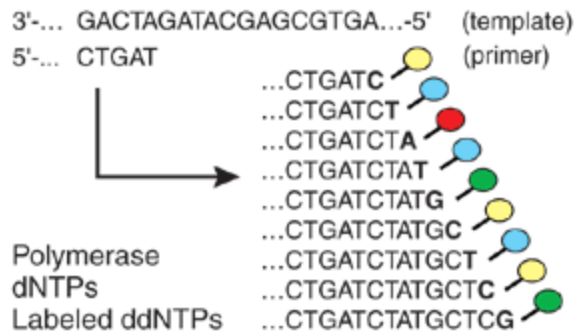




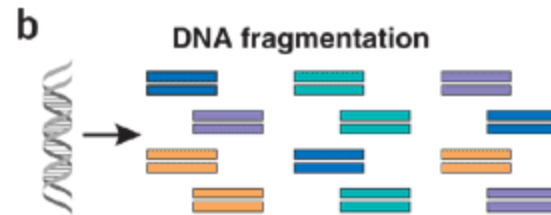
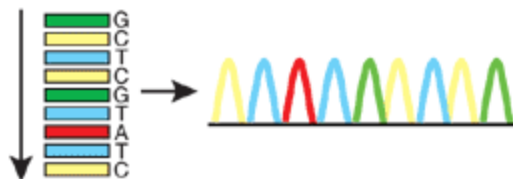
In vivo cloning and amplification



Cycle sequencing



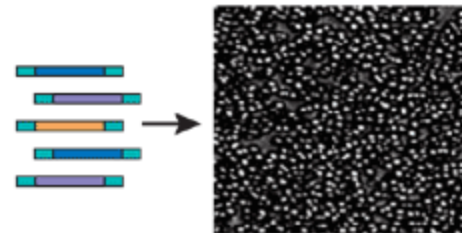
**Electrophoresis
 (1 read/capillary)**



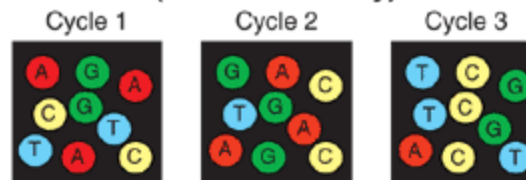
In vitro adaptor ligation



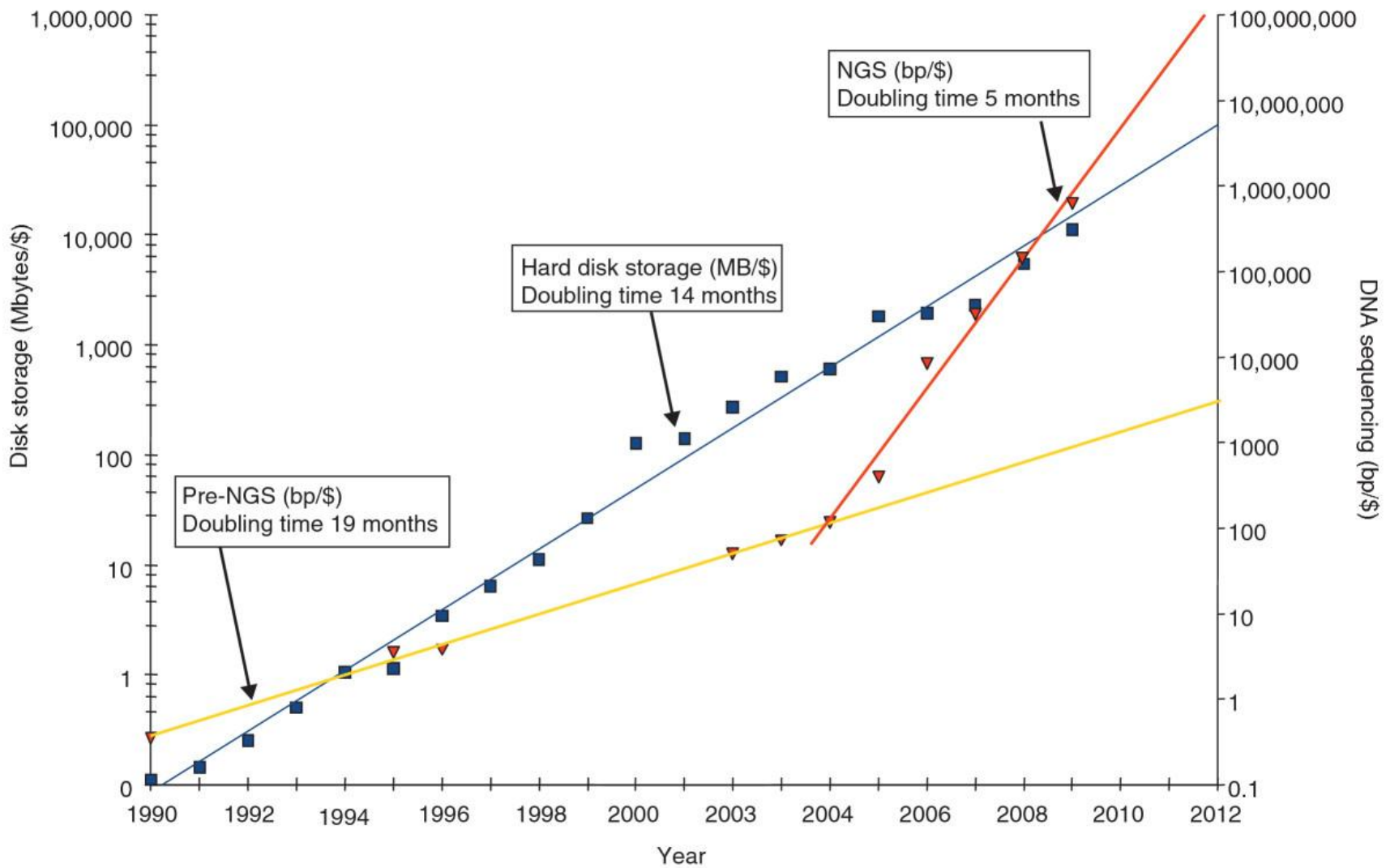
Generation of polony array



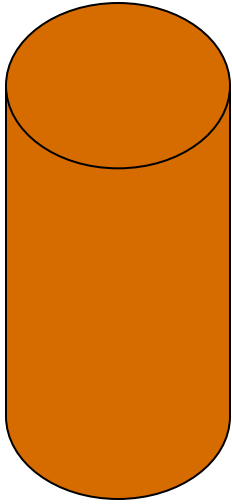
**Cyclic array sequencing
 (>10⁶ reads/array)**



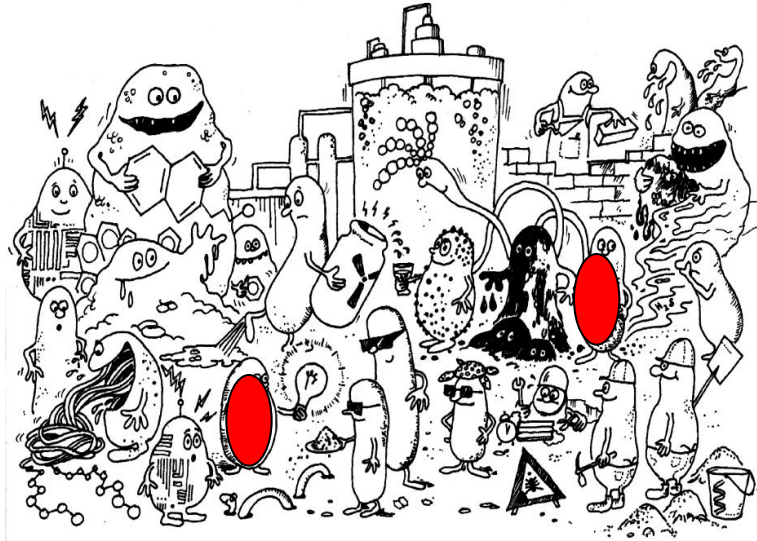
What is base 1? What is base 2? What is base 3?



Outils de suivi et d'observation

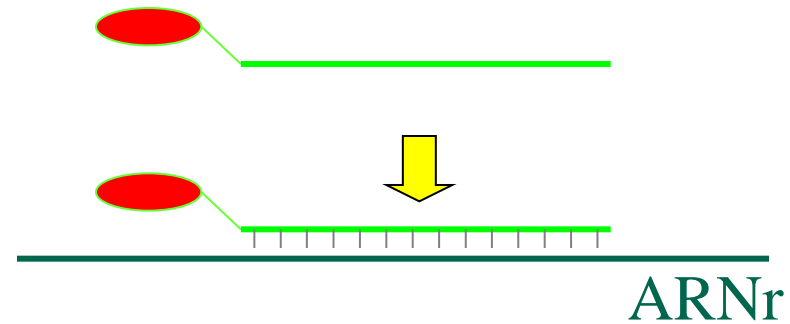


=



Outils moléculaires de suivi des communautés microbiennes

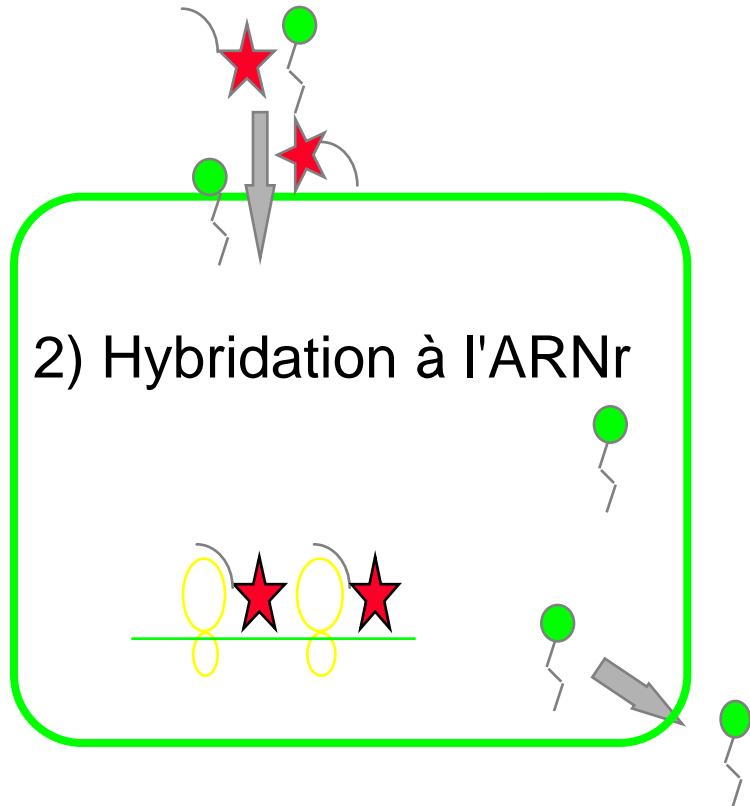
les sondes nucléiques
(avec connaissances préalables)



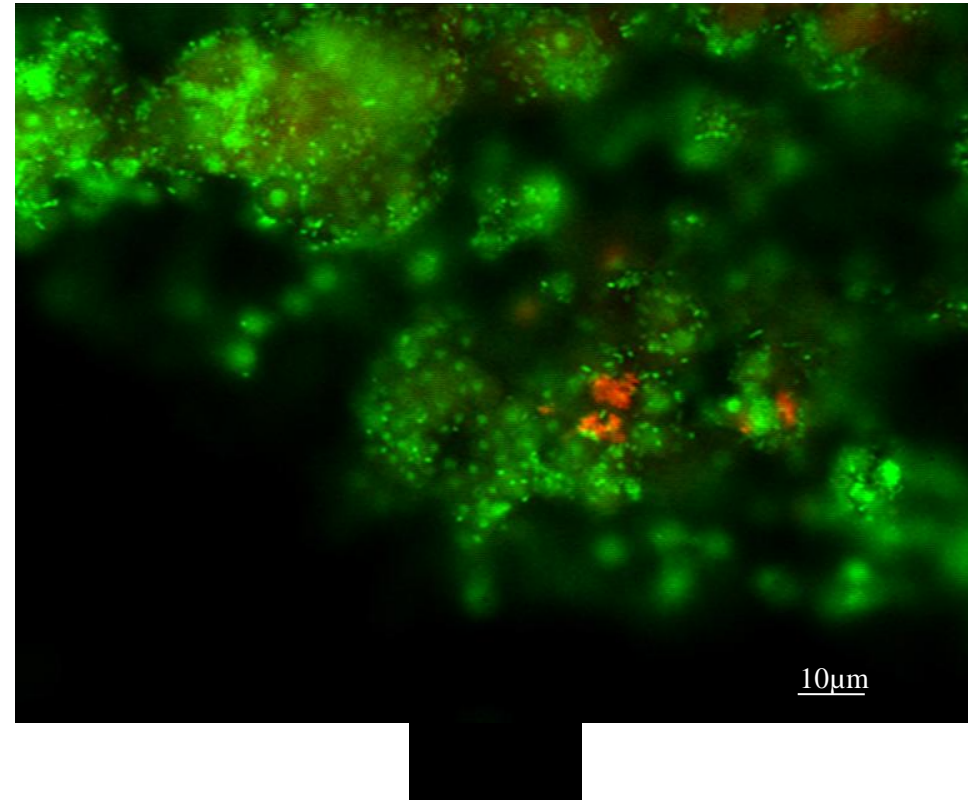
Sondes nucléiques

FISH (Fluorescent *in situ* hybridization)

1) Pénétration de la sonde marquée à l'intérieur de la cellule

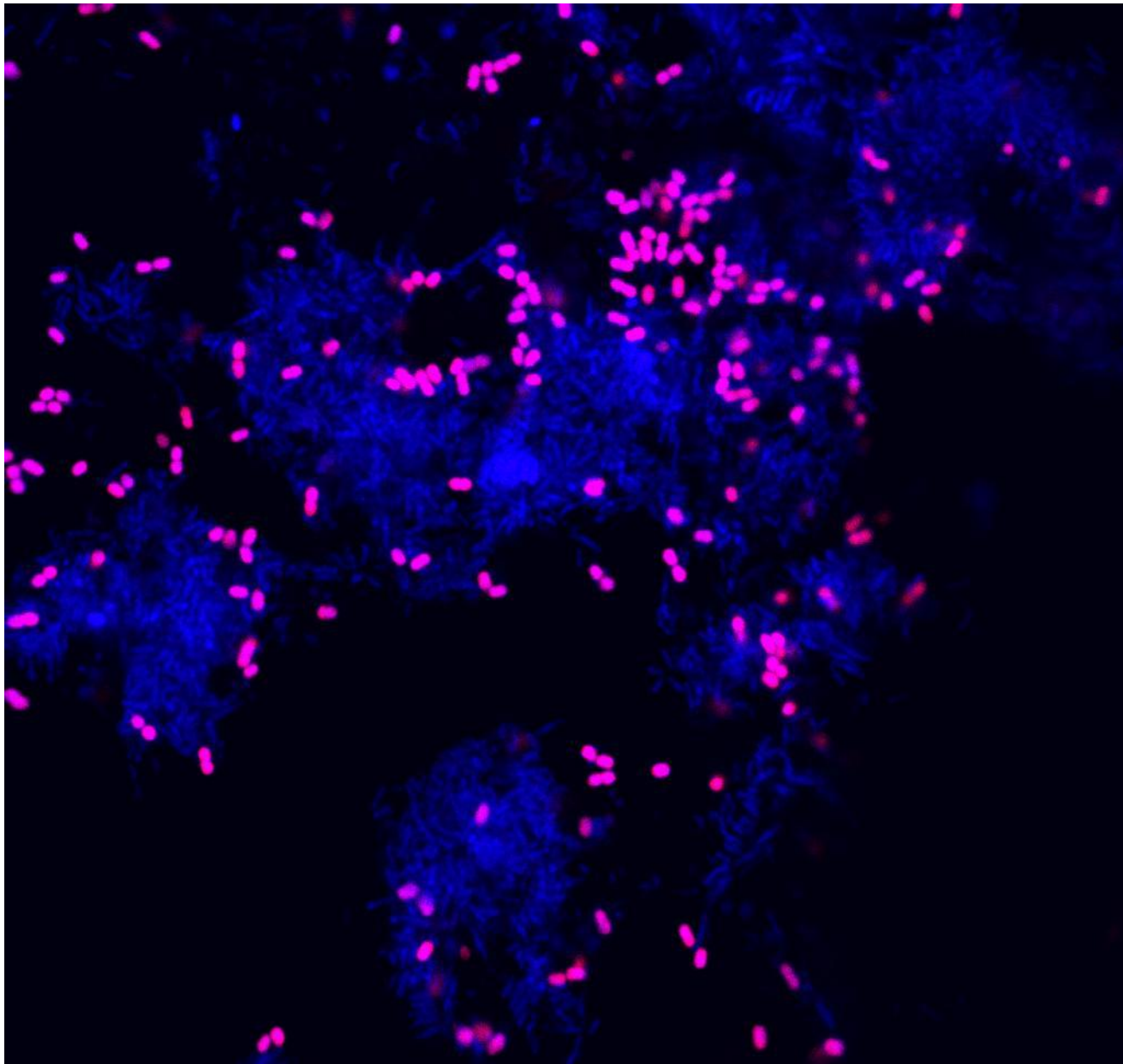


2) Hybridation à l'ARNr



3) Lavage et élimination des sondes non spécifiques (+ coloration DAPI)

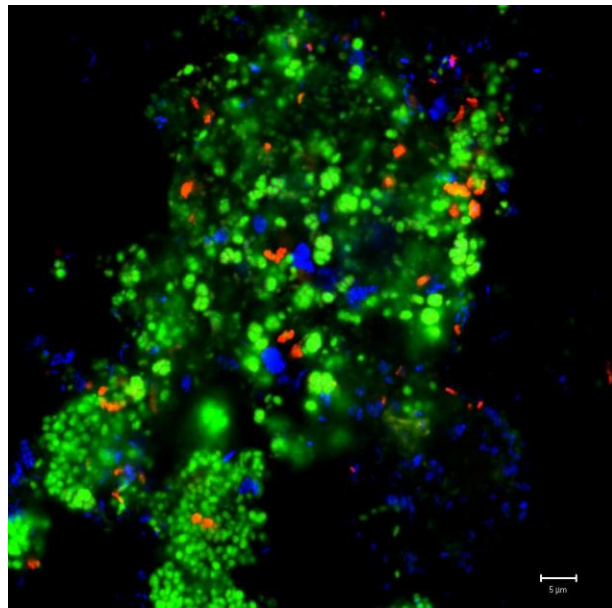
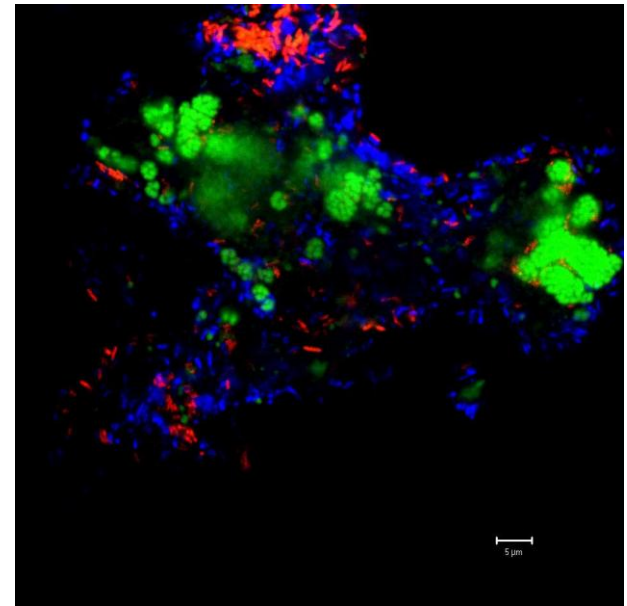
NEU (*Nitrosomonas*)
Microvirgula aerodenitrificans



ACA Cy3 / Eub338 Cy5

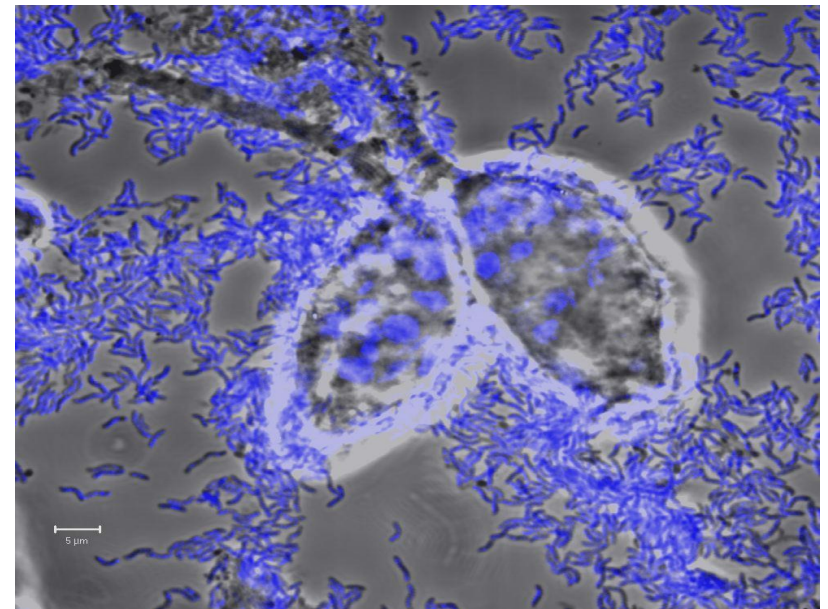
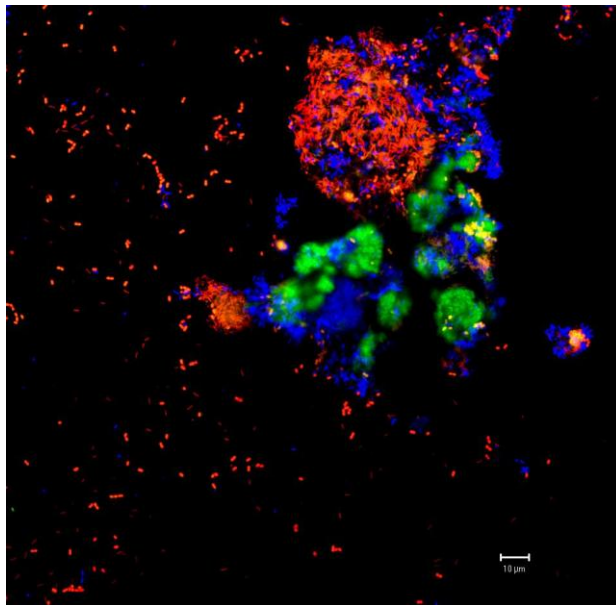
Bouchez *et al.* (2000)
Environ. Microbiol.

Écosystème
nitrifiant



↓ + acétate

+ *M. aerodenitrificans* & acétate



spatialisation

Digestion anaérobie en UASB

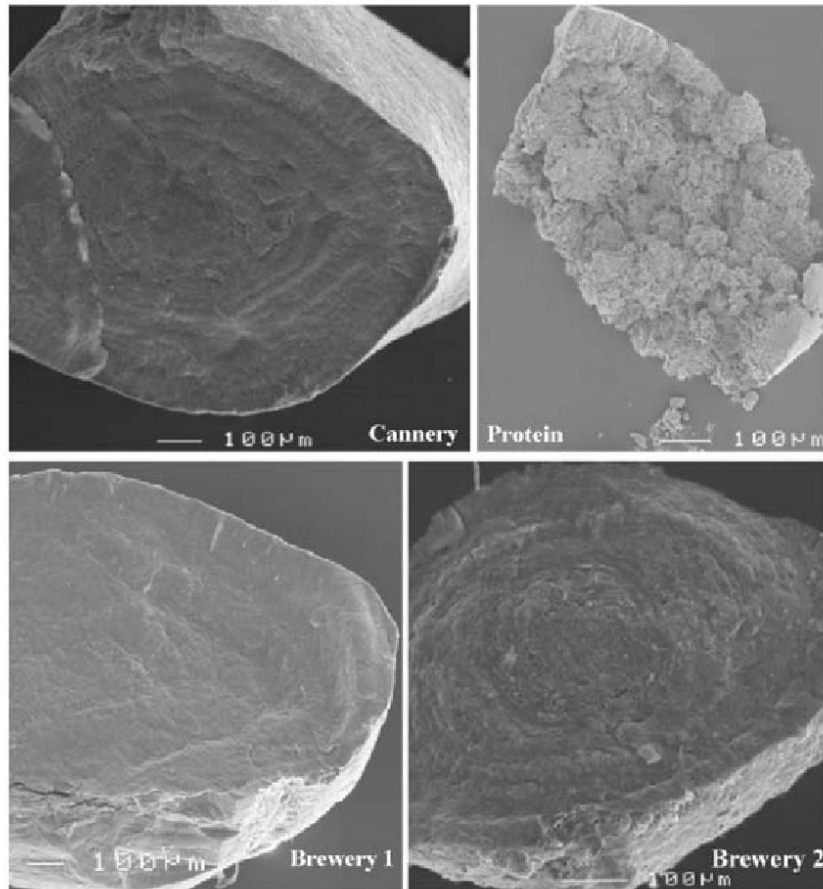
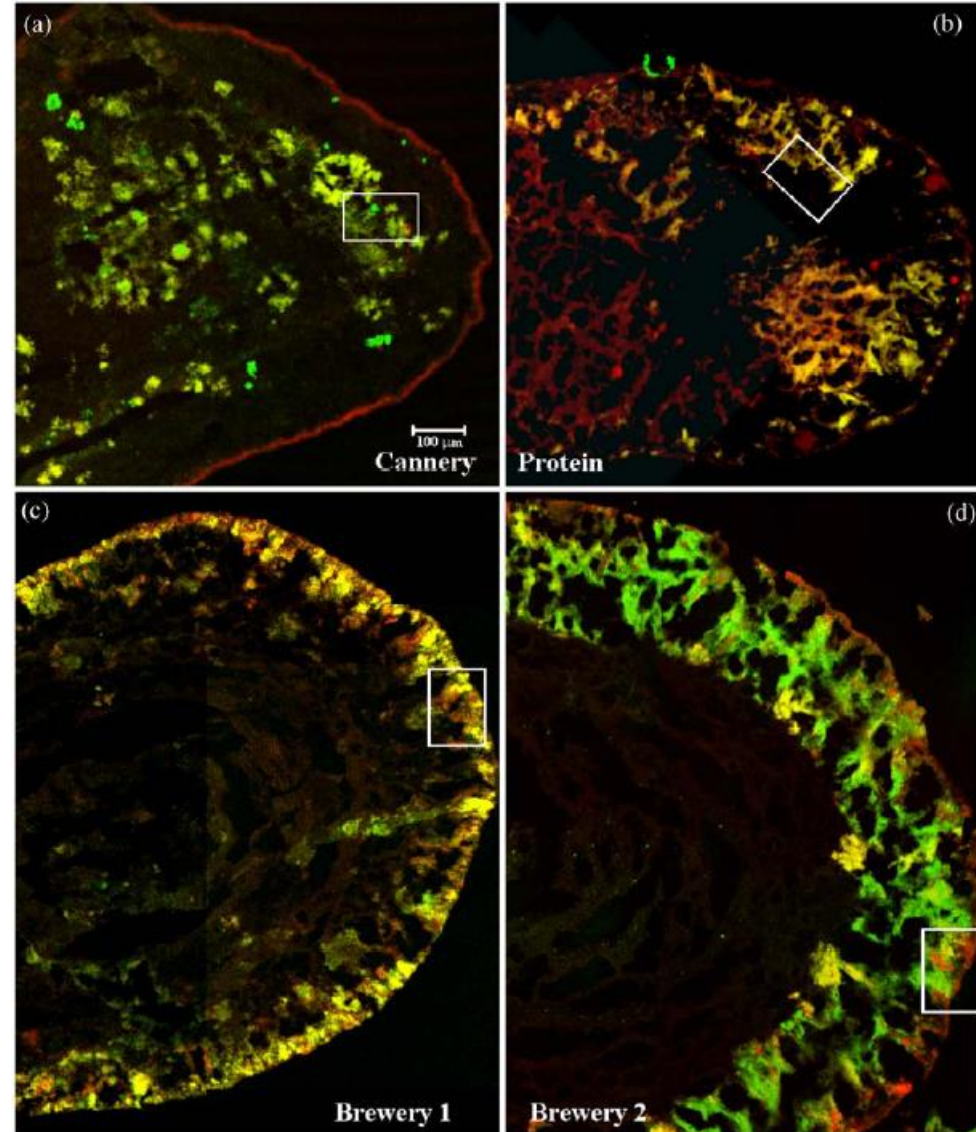


Fig. 3. Low magnification SEM images of the four granules showing gross structuring, and density (i.e., fraction occupied volume).

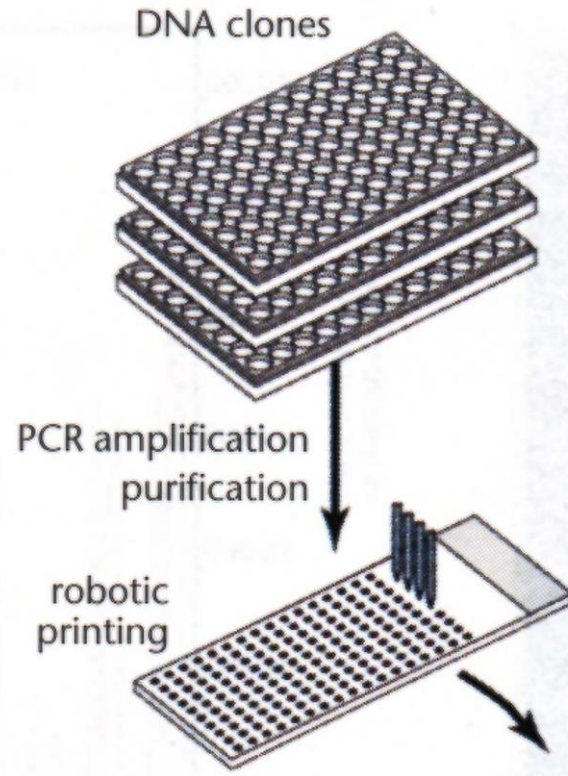


Bactéries acidogènes **Archaea méthanogènes**

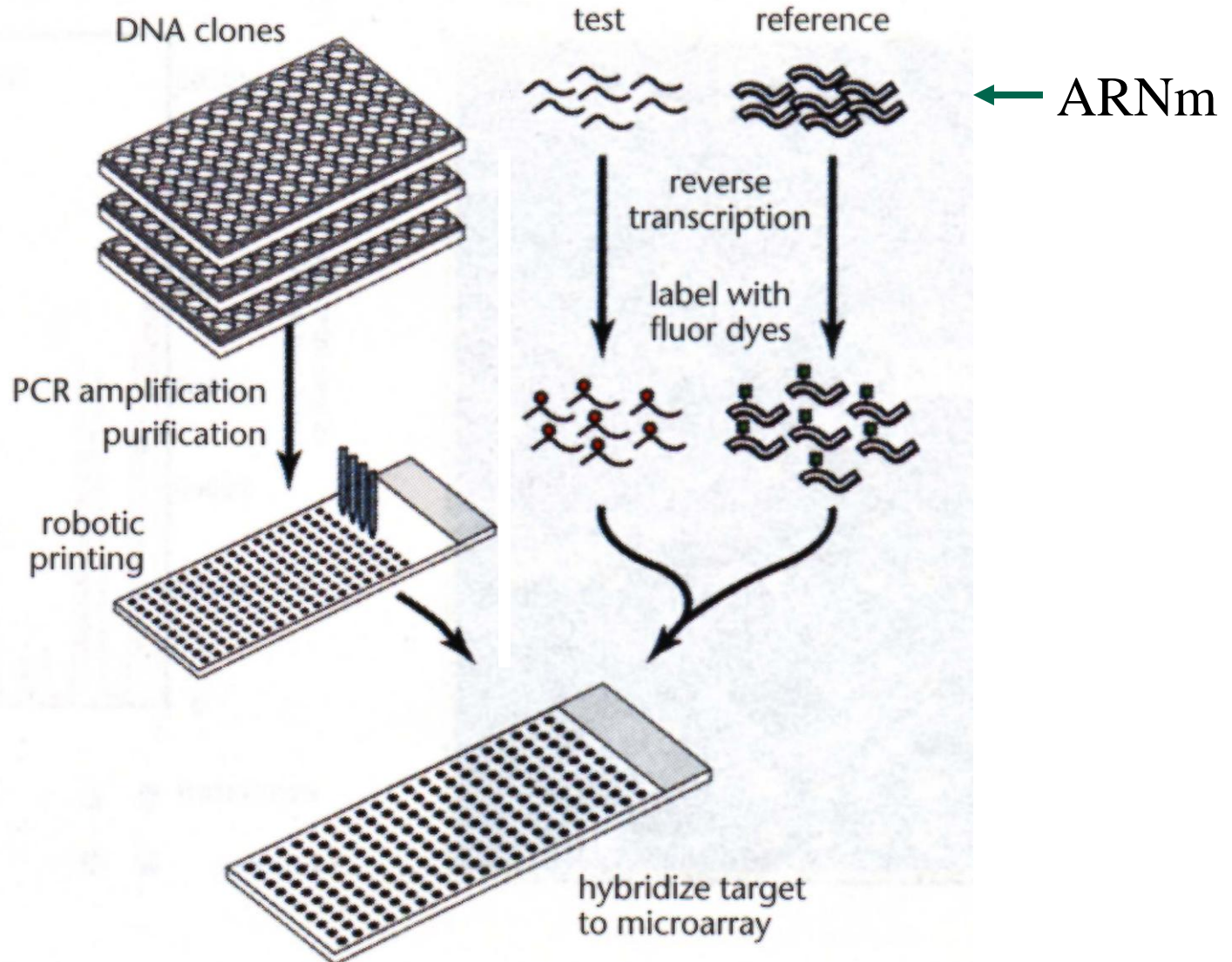
Le futur : les puces à ADN?

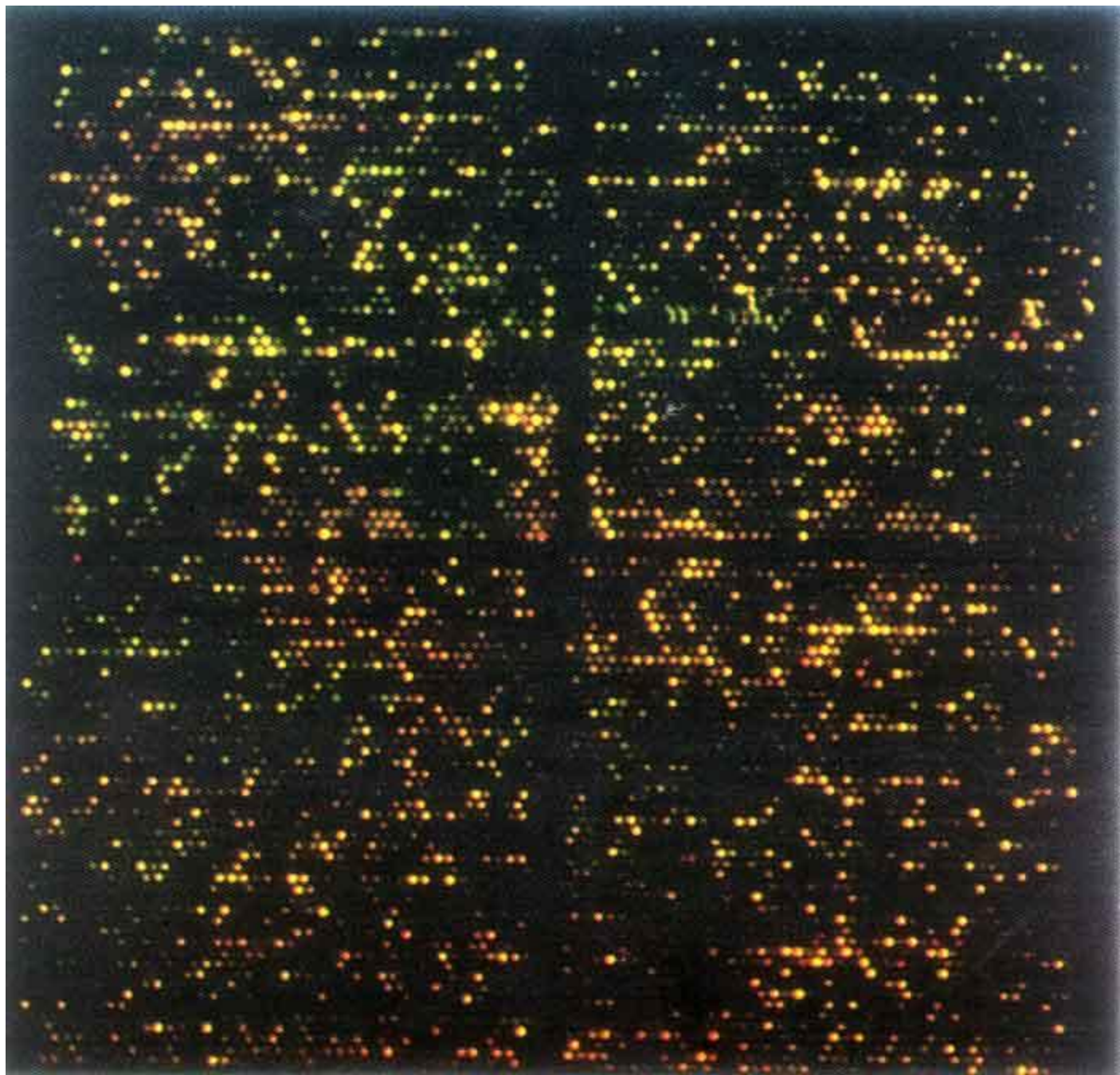
Tous les gènes
d'un génome

Plusieurs espèces



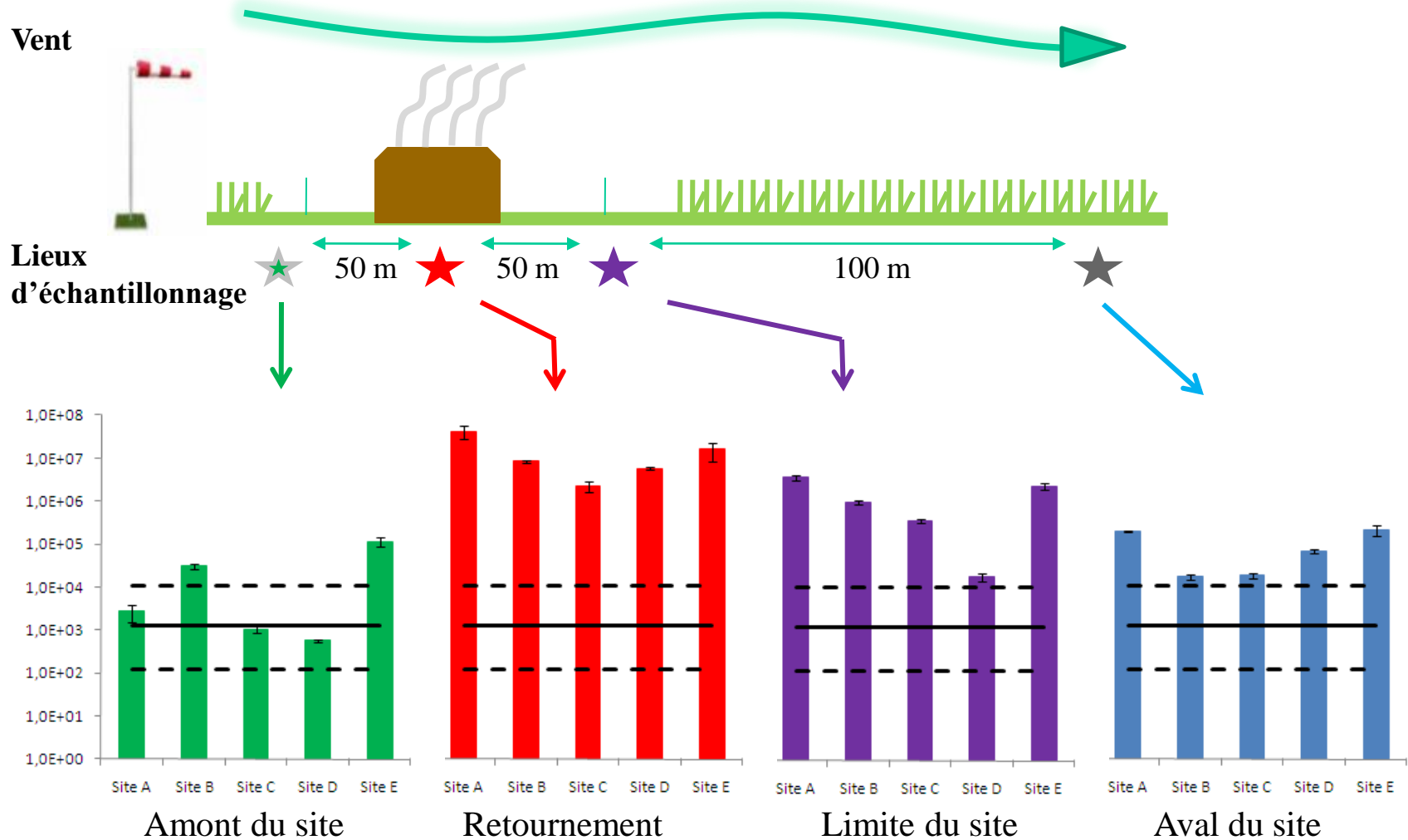
Le futur : les puces à ADN





Autres outil très utilisé la PCR quantitative

Aérosols de compost qPCR



70 *Abondance de Saccharopolyspora rectivirgula (PCRq)*

Quels concepts?

Somme d'espece?

Ecosystèmes ?

Organismes pluricellulaire ?

Ça c'est un écosystème!



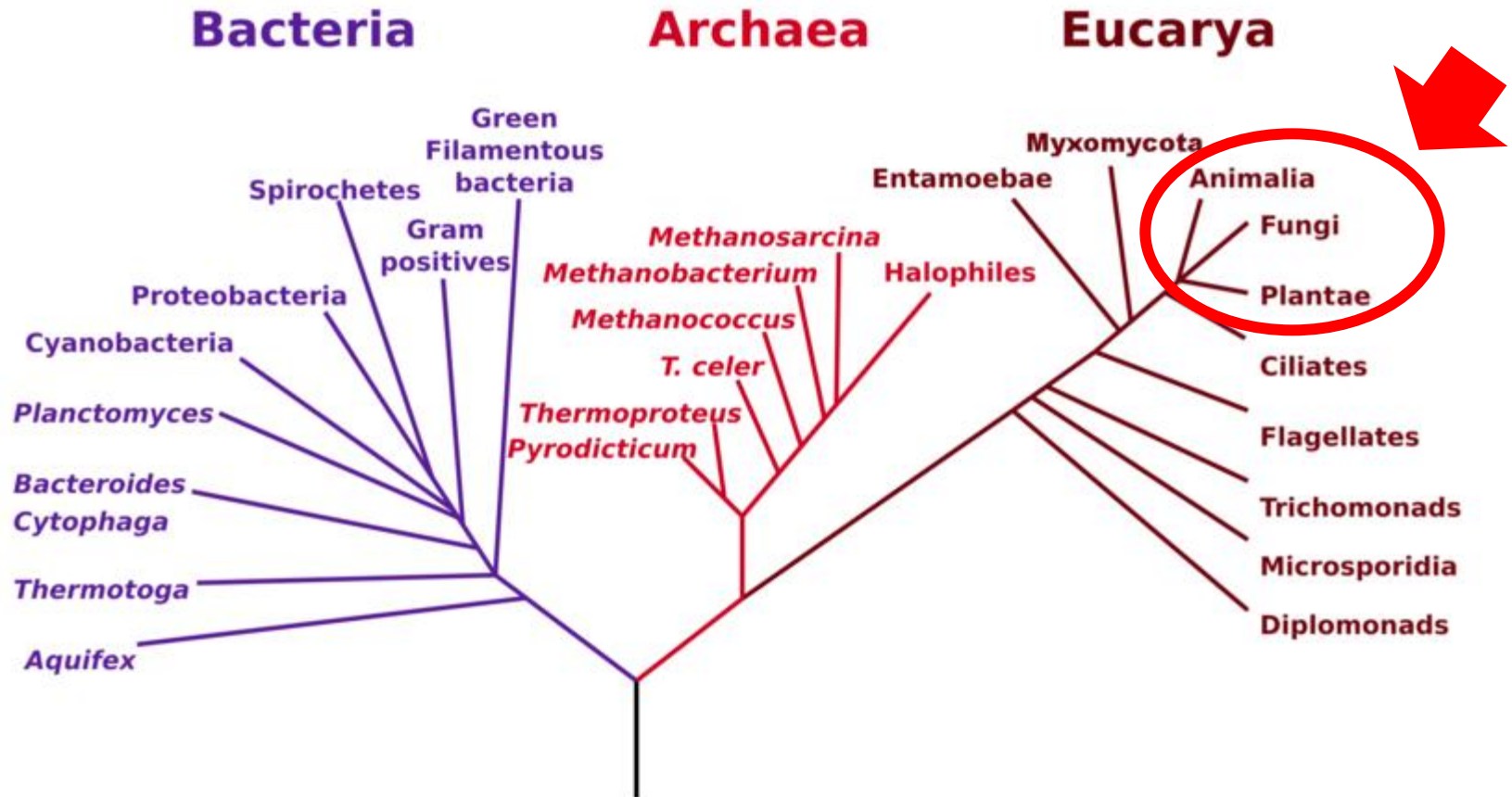
Dès sa découverte, le monde microscopique a été vu comme copie du monde visible

Mêmes concepts, même dogmes, mêmes paradigmes, même vision des organismes, etc.

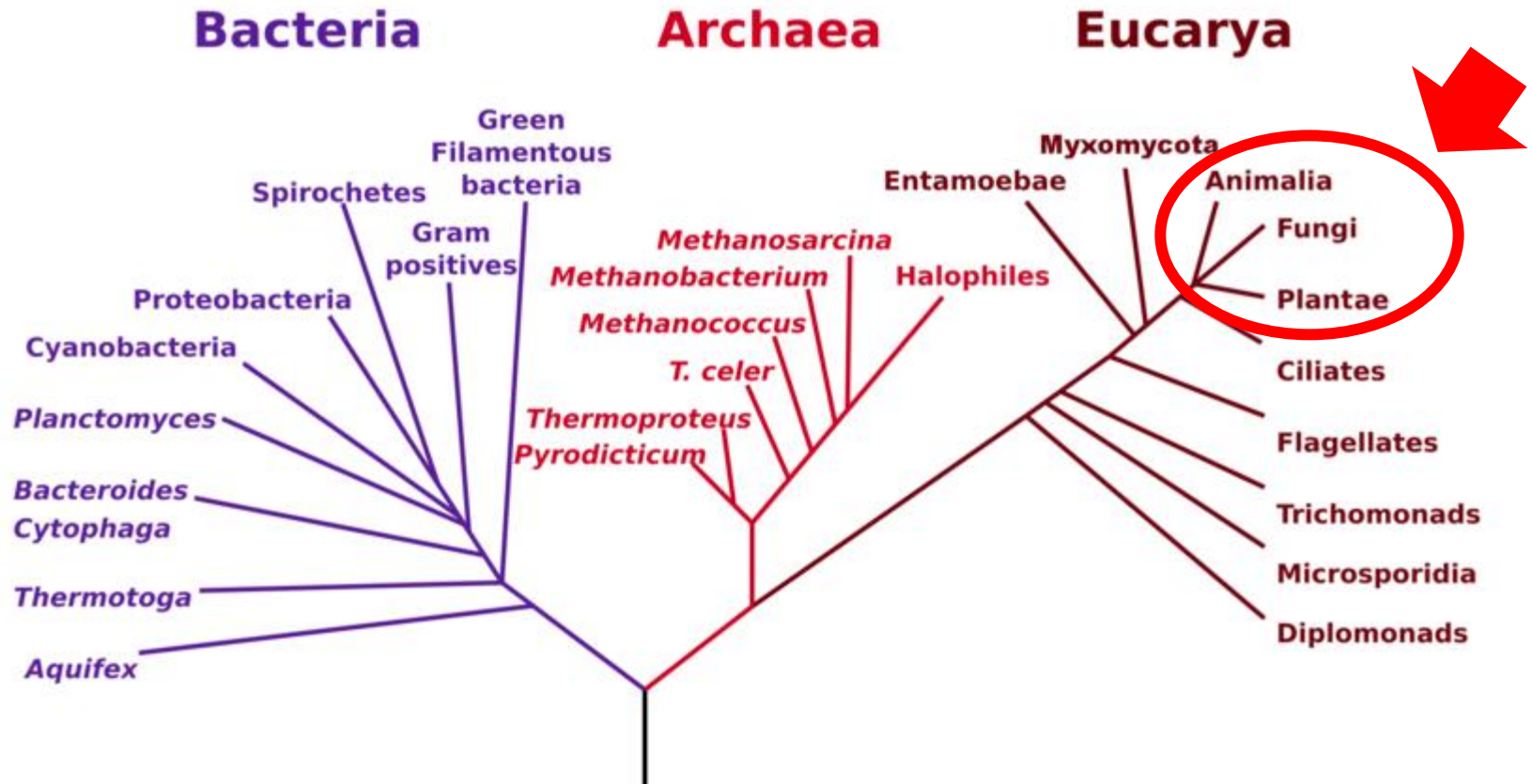
Aujourd'hui, pourquoi pas la même écologie ?



Les macro-organismes ne sont qu'un phénomène 'récent d'une grande proximité phylogénétique



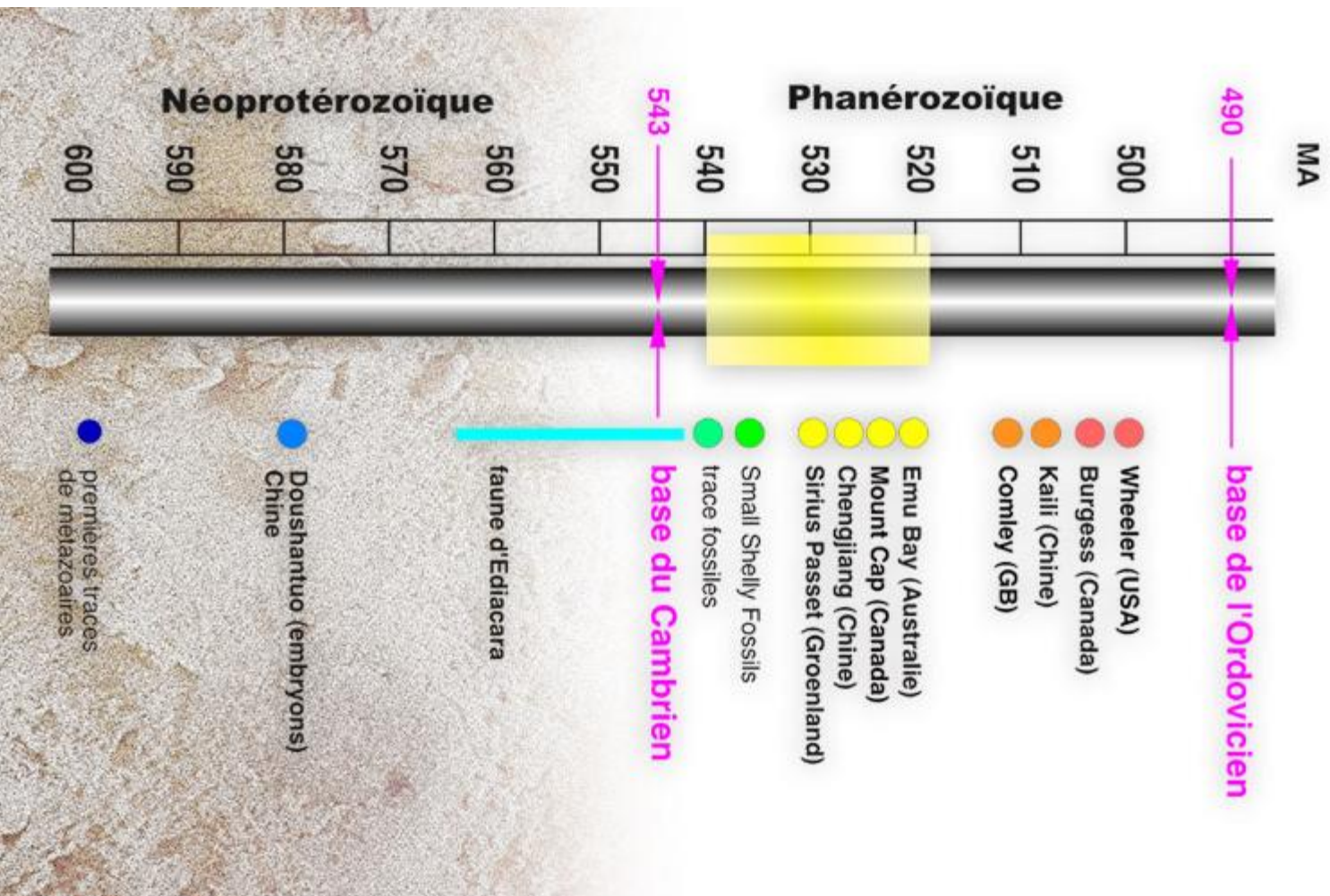
Les macro-organismes ne sont qu'un phénomène récent d'une grande proximité phylogénétique



Our planet has always been in the "Age of *Bacteria*," ever since the first ... *bacteria* are—and always have been—the *dominant forms of life on Earth*

[Stephen Jay Gould](#)

500 000 000 ans



Définition de l'écologie :

'les interactions entre un organisme vivant et son milieu de vie'

Définir:

- **L'organisme vivant**
- **Son unicité**
- **Sa spécificité**

Premier problème c'est quoi une espèce

Des points communs ont permis historiquement la confusion

Le 'modèle' étant les macro-organismes

Début de la microbiologie

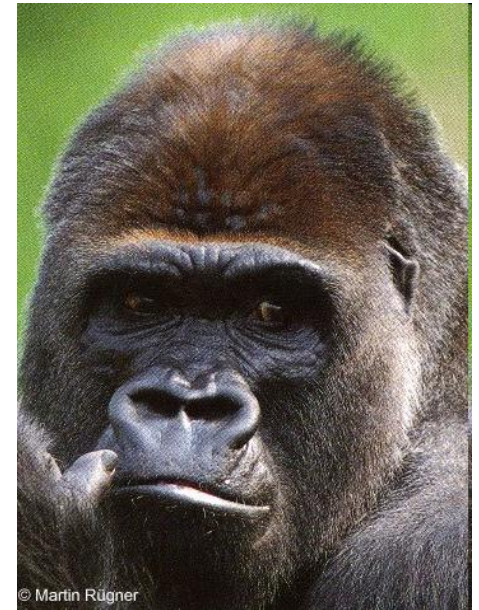
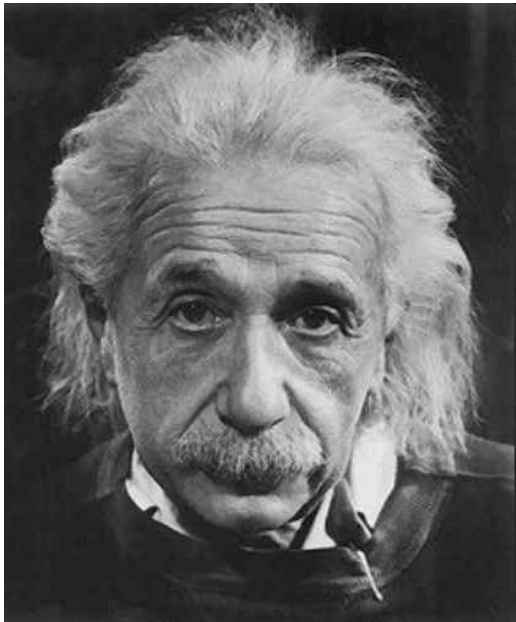
isolement

culture

phénotype



Notion d'espèce ?



Pas la même sexualité

Macro



Reproduction et sexualité liées



Défini l'espèce



Mortel

Micro



Reproduction et sexualité dissociées



Pas d'espèce



Immortel

Notion d'espèce (classique)

Phénotype

Défini par une fonction(qui peut être inactive ou transférée)

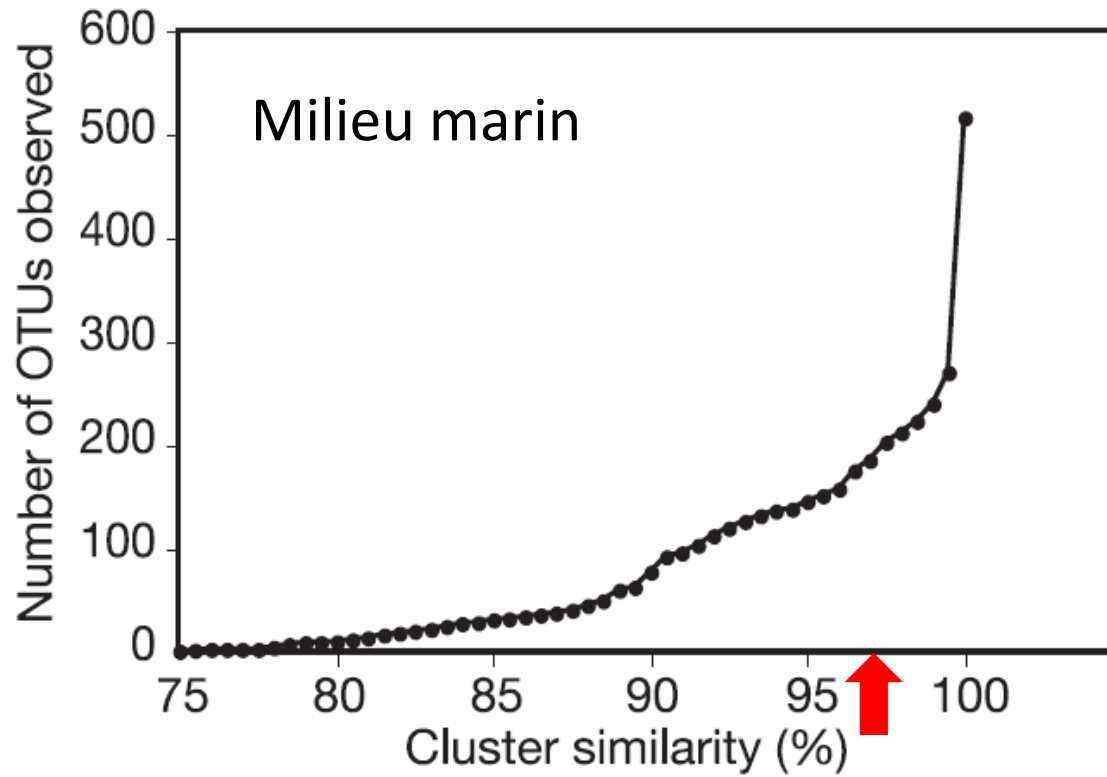
Demande culture et isolement (1% des bactérie)

Pas de fondement moléculaire

Notion d'espèce moléculaire

Si pas de sexualité ?

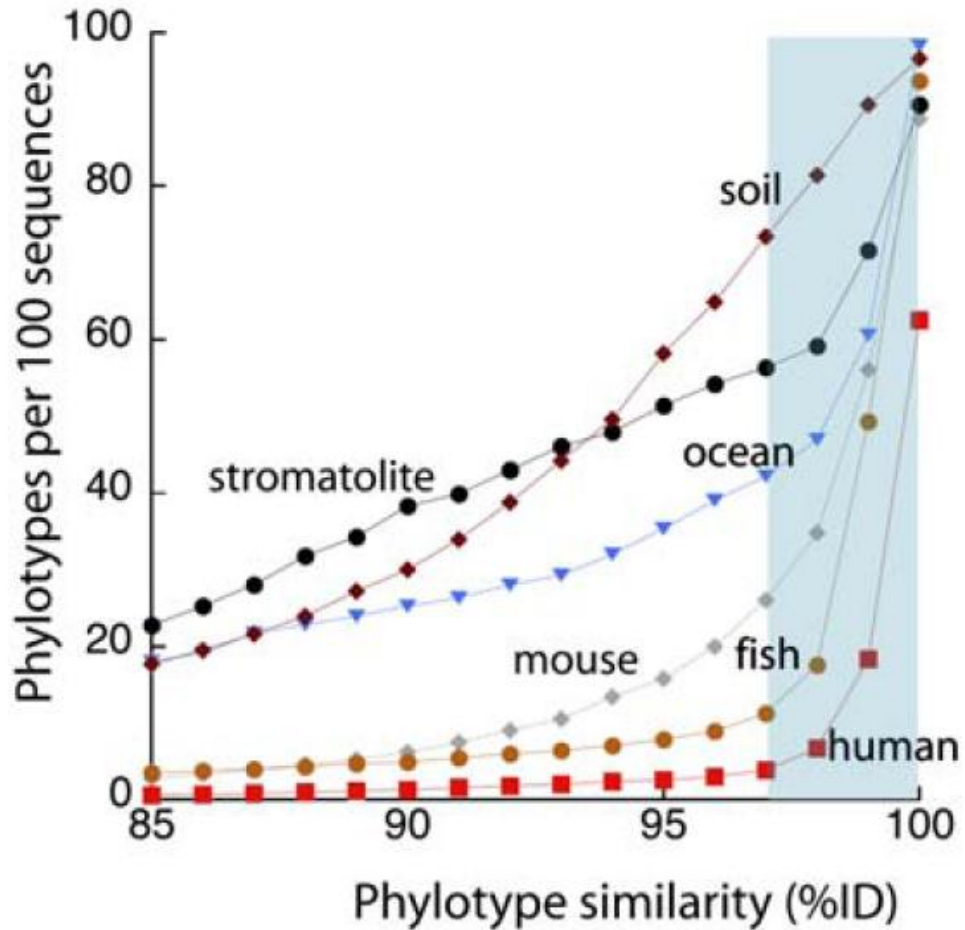
ADNr 16S



Nombre d'unités en fonction du % de similarité

97%

Variable avec le biotope !

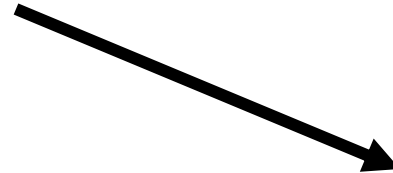
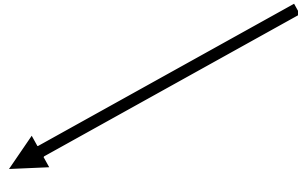
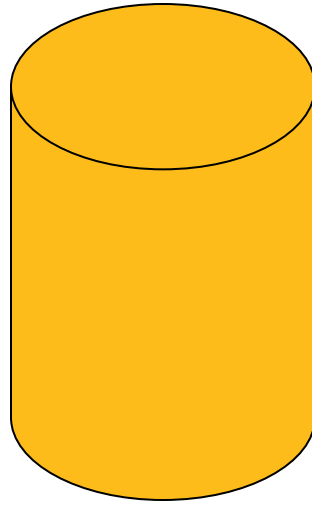


Variable aussi avec les phyla!

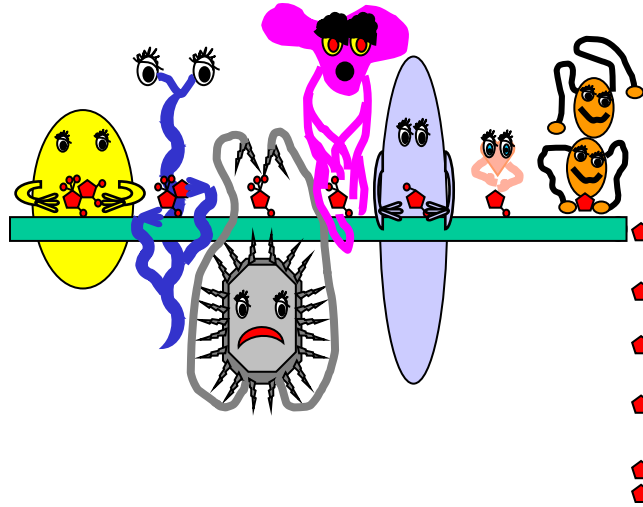
continuum

Individus rien d'autre...

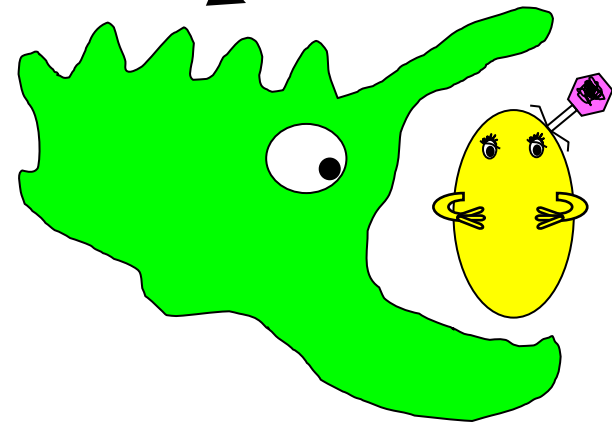
Black box



Microbiologist view



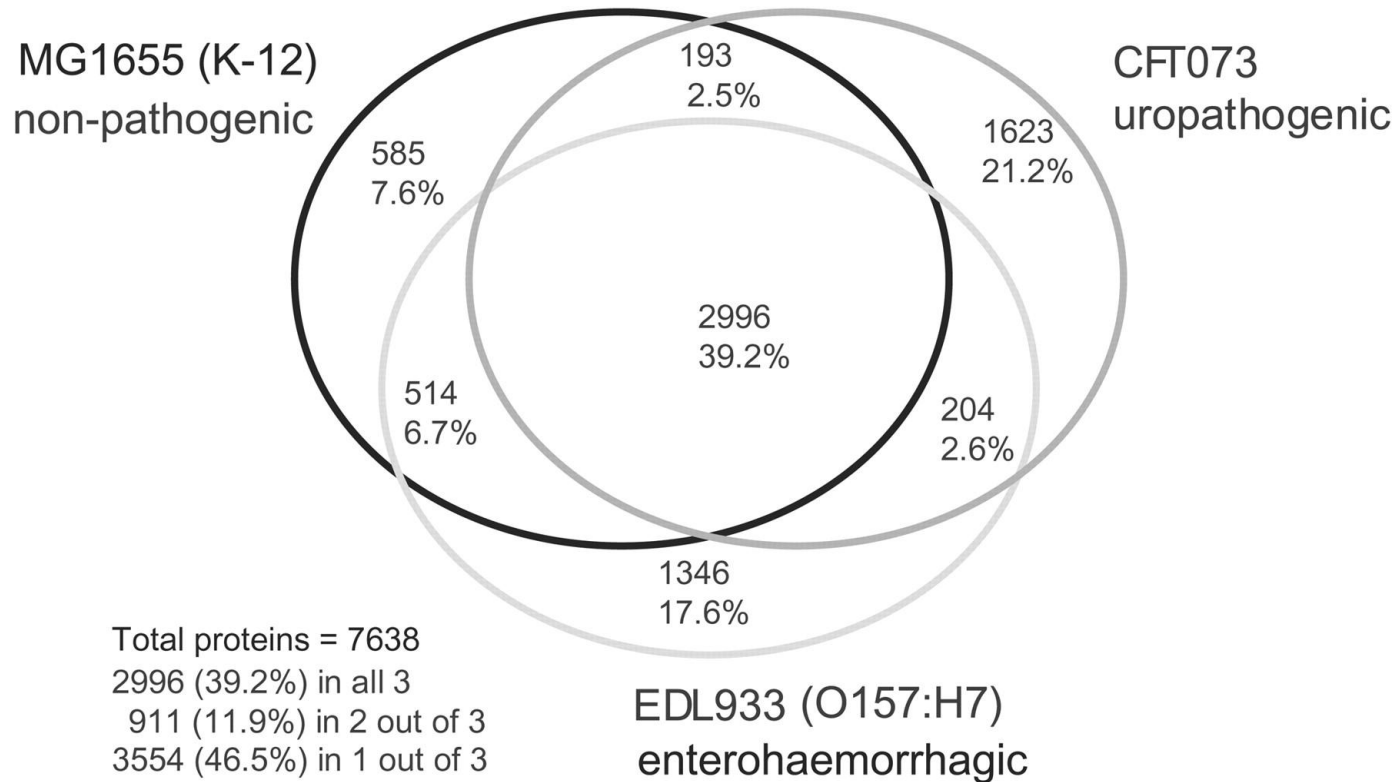
Engineer view



Ecologist view

Notion d'espèce moléculaire Avec sexualité ? Notion de core et pan genome

Protéines communes à 3 *E.coli*



Le core génome dépend de la définition préalable d'une espèce

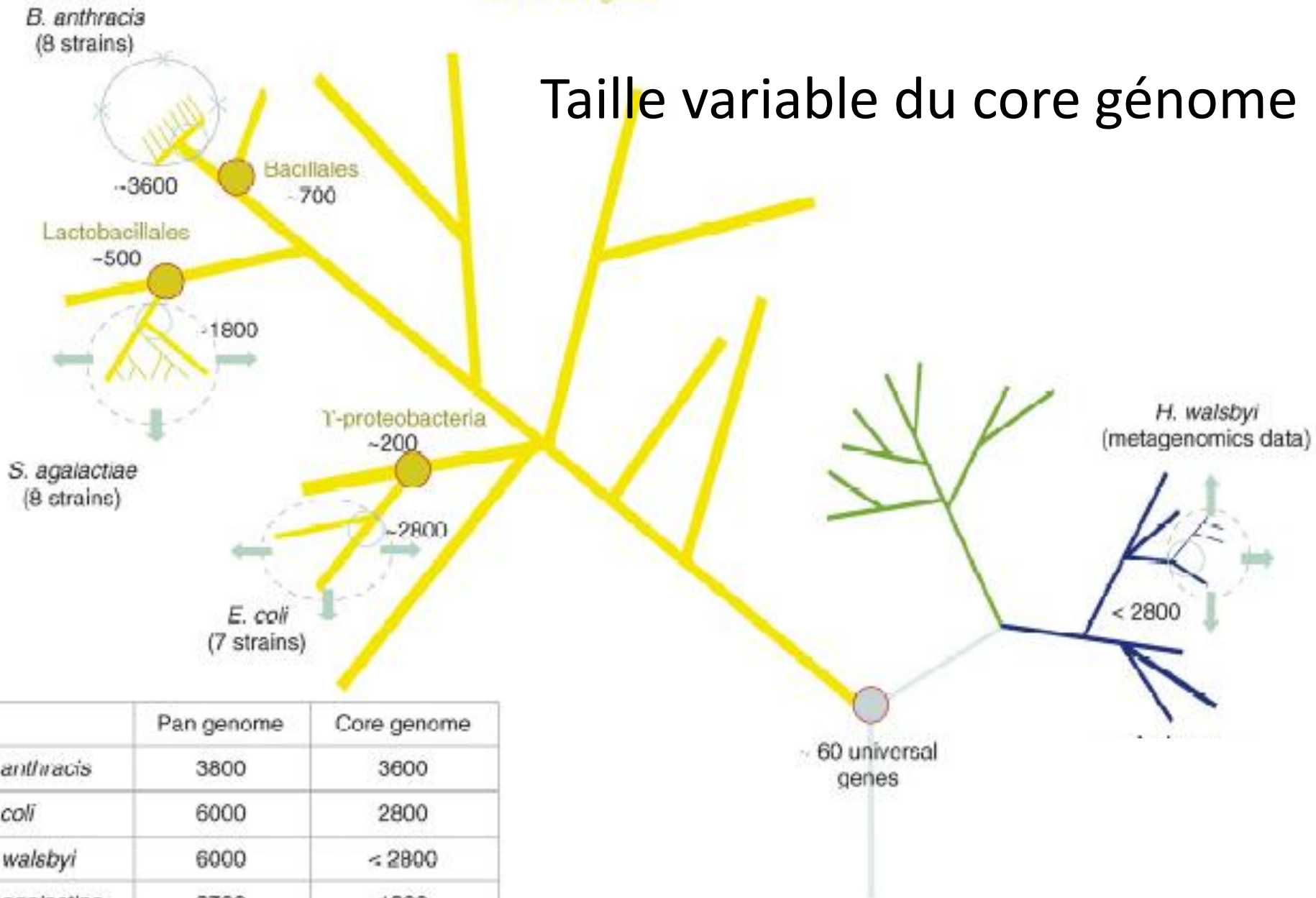
Exemple:

on prend l'espèce *E coli* (sur des critères phénotypiques) et on définit le core génome

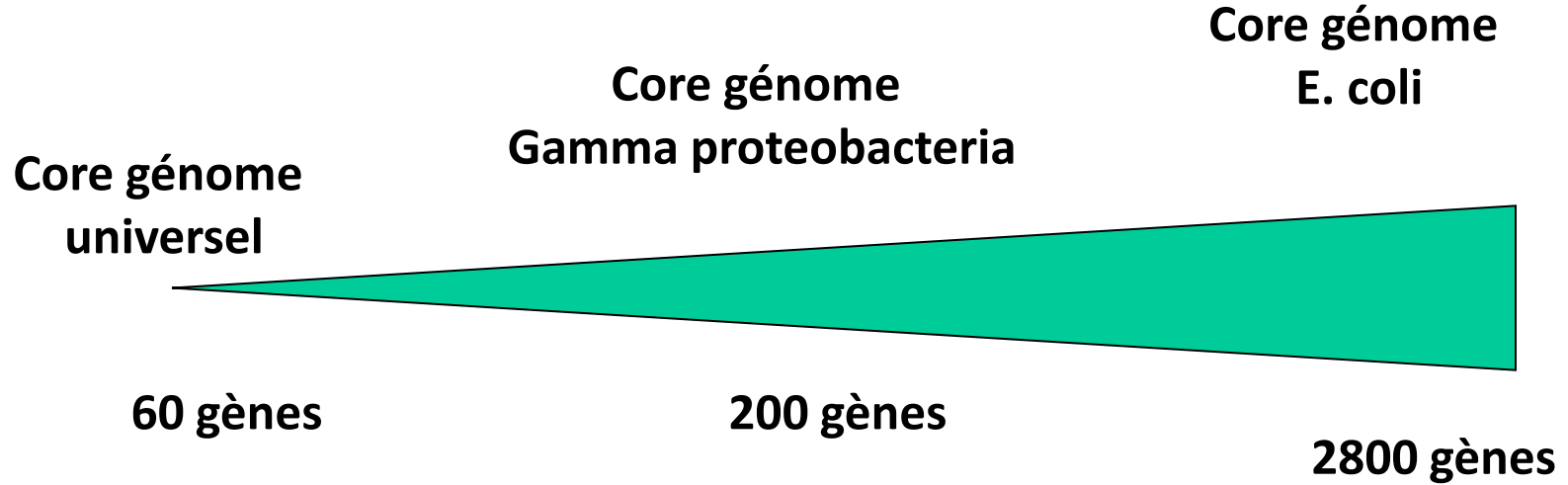
Actuellement, individu séquencé (NCBI)

| | | |
|-----------|----|-------------|
| En cours | => | 198 projets |
| Assemblés | => | 72 projets |
| Complet | => | 38 projets |

Taille variable du core génome



| | Pan genome | Core genome |
|----------------------|------------|-------------|
| <i>B. anthracis</i> | 3800 | 3600 |
| <i>E. coli</i> | 6000 | 2800 |
| <i>H. walsbyi</i> | 6000 | < 2800 |
| <i>S. agalactiae</i> | 2700 | 1800 |



Fréquence de recombinaison baisse avec la divergence des génomes

Un génome est un instantané

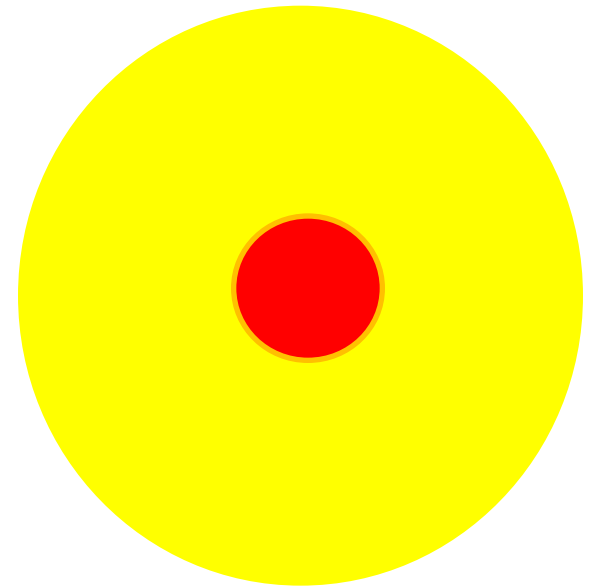
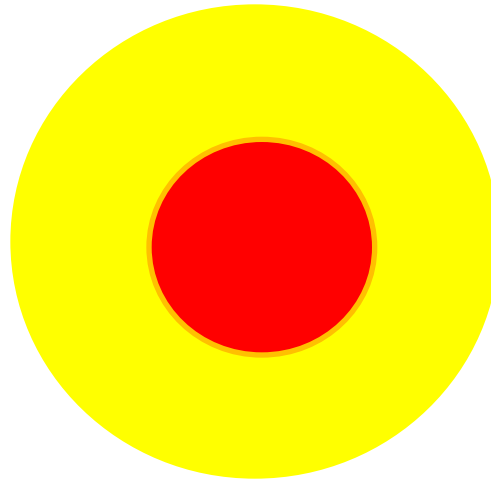
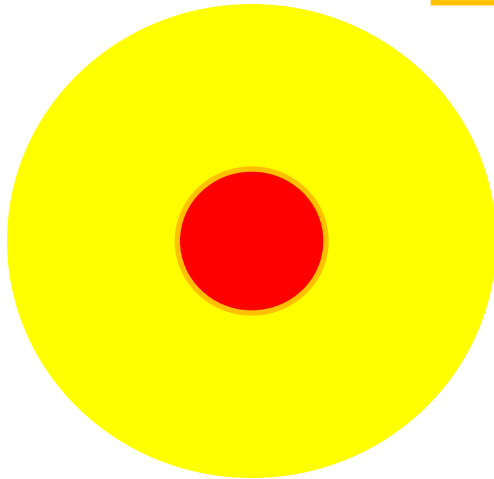
continuum



Pan génome => varie avec le nombre d'individus analysés



core génome => varie avec l'entité choisie



Taux de recombinaison (données MLST)

| Species | % Acquired genes ^a | Recombination rate ^b | | | |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--|--|----------------------------------|
| | | Number of loci tested | Average number of alleles ^c | Polymorphic sites per locus ^d | Recombination level ^e |
| <i>Bacillus cereus</i> | — | 7 | 32 | 405 | Low |
| <i>Burkholderia pseudomallei</i> | — | 6 | 19 | 493 | Low |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 3 | 7 | 1031 | 473 | Low |
| <i>Escherichia coli</i> | 12–25 | 12 | 44 | 668 | Low ^f |
| <i>Enterococcus faecum</i> | — | 7 | 24 | 494 | Low |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 11–15 | 7 | 58 | 457 | Low |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 10 | 7 | 8 | 454 | Low |
| <i>Vibrio vulnificus</i> | 14 | 10 | 34 | 433 | Low |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | — | 7 | 9 | 24 | Low |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | — | 6 | 14 | 475 | Low |
| <i>Haemophilus influenza</i> | 4–9 | 7 | 34 | 437 | Medium |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 11–15 | 7 | 21 | 494 | Medium |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 11–18 | 7 | 62 | 448 | Medium |
| <i>Bacillus weihenstephanensis</i> | — | 6 | 17 | 475 | Medium |
| <i>Clostridium difficile</i> | — | 7 | 7 | 377 | Medium |
| <i>Helicobacter pylori</i> | 6–9 | 8 | 323 | 481 | High |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | — | 8 | 39 | 438 | High |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | — | 15 | 10 | 1014 | High |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 17–22 | 6 | 235 | 466 | High |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 16–18 | 7 | 95 | 457 | High |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 11 | 7 | 33 | 411 | High |
| <i>Oenococcus oeni</i> | — | 5 | 8 | 456 | High |
| <i>Wolbachia pipiens</i> | — | 4 | — | — | High |

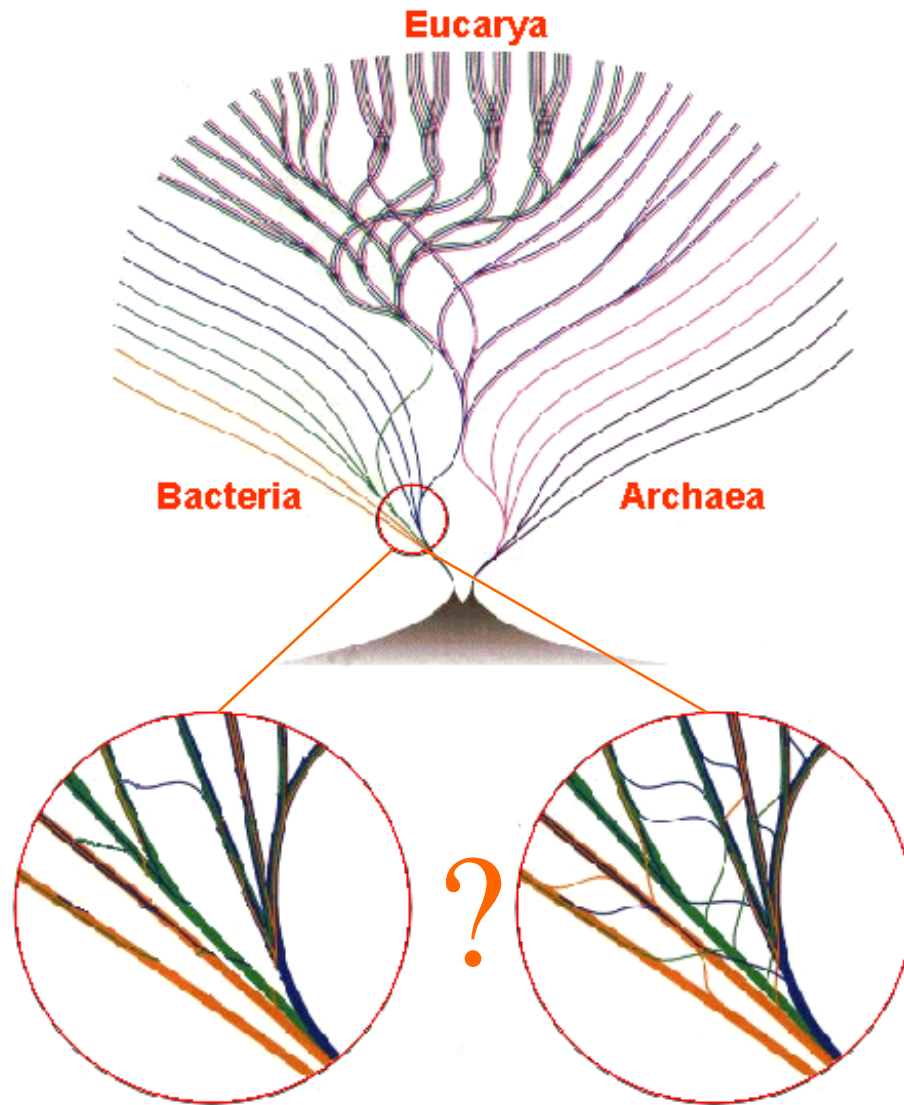
Table 1. Genomic fractions of laterally acquired genes (as estimated by compositional characteristics) and levels of recombination (as assayed by MLST) in selected bacterial species.

Le séquençage montre que les génomes sont des puzzles

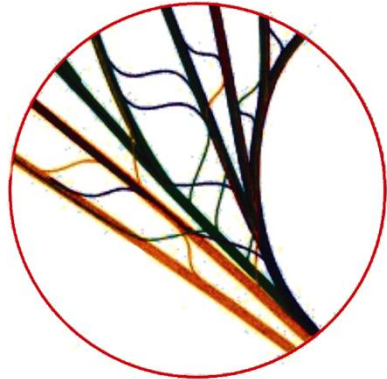
Émerveillement 'curieux' sur les transferts de gènes

Tout se transfère, juste une question de fréquence et de sélection

Horizontal gene transfer (HGT)



HGT: Prokaryotes vs. eukaryotes

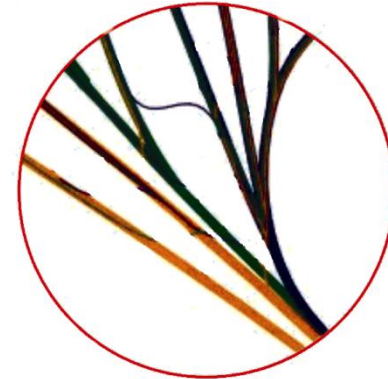


PROKARYOTES

- Massive HGT
- No species



HGT is a (*the*)
major force in
bacterial evolution



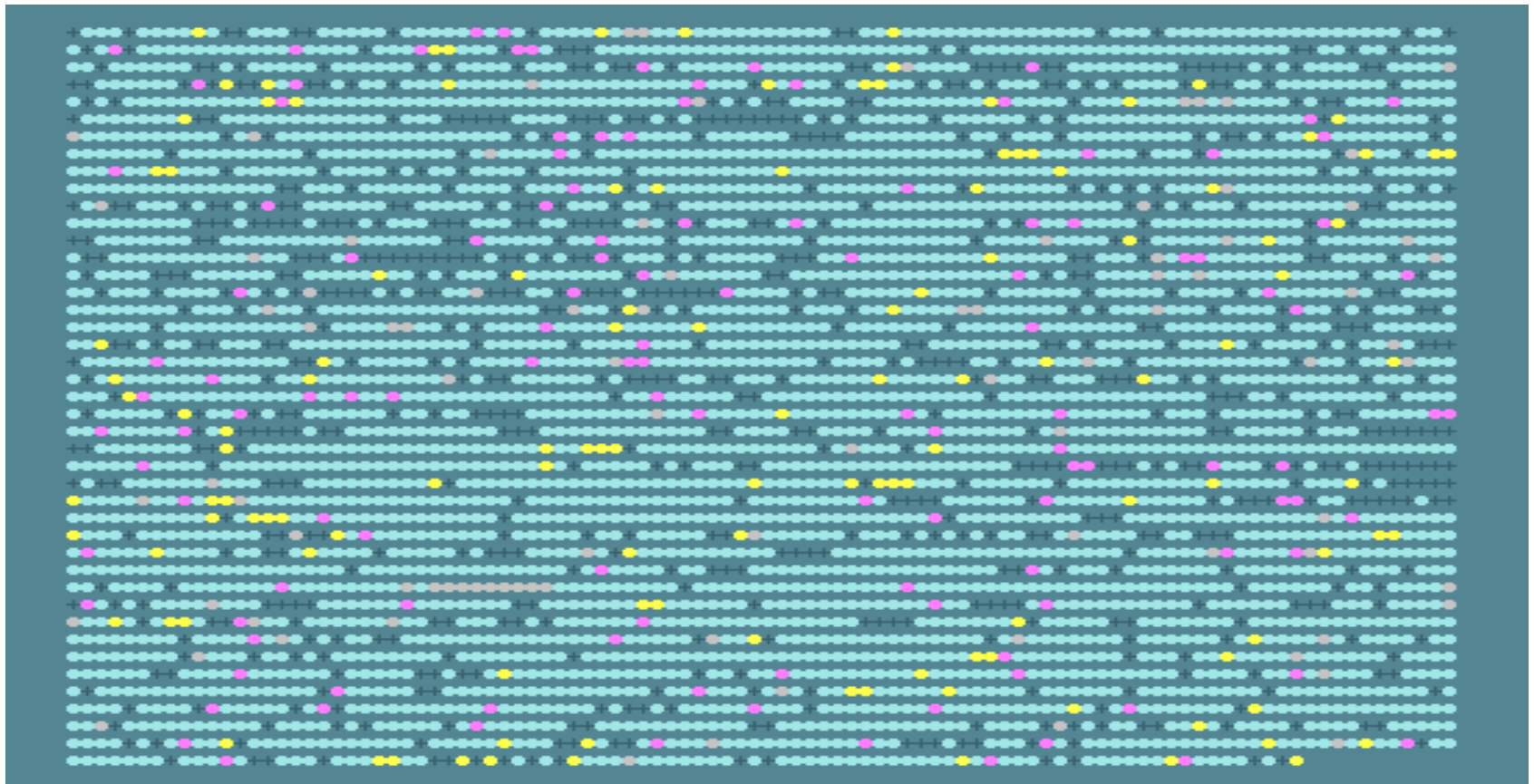
EUKARYOTES

- No HGT
- “Discrete” species



HGT is irrelevant
in eukaryotic
evolution

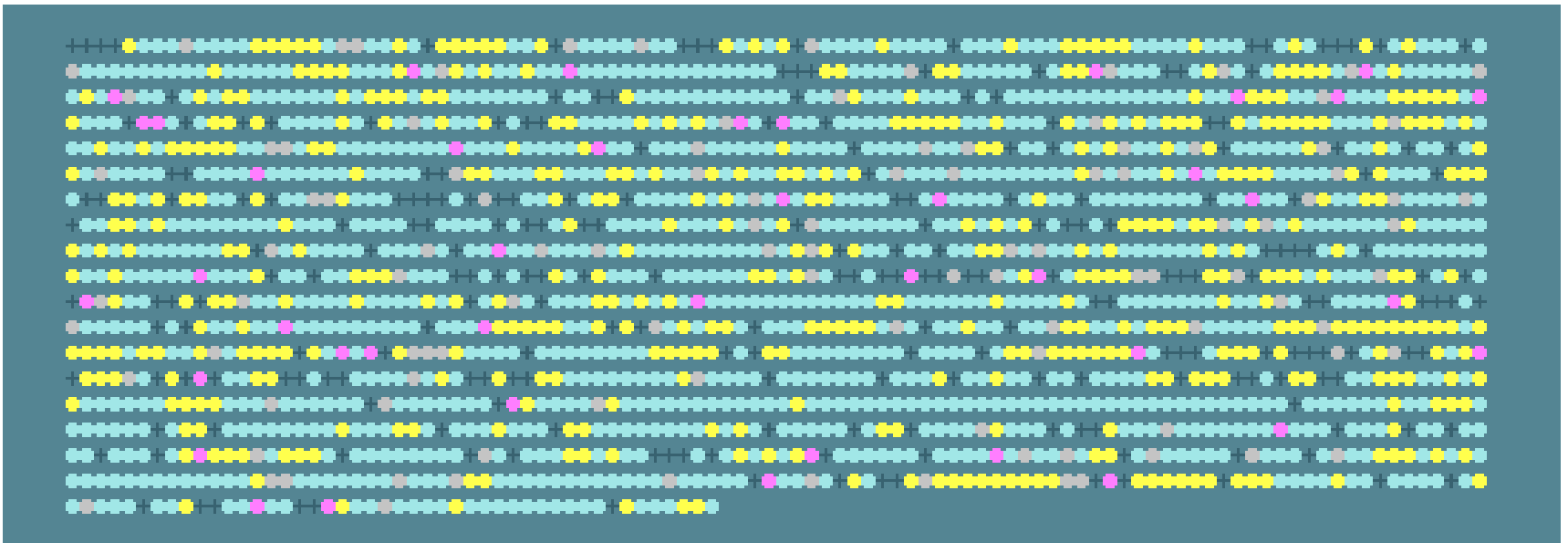
Escherichia coli genome



Taxonomic affinity:

- Bacterial
- Archaeal
- Eukaryotic

Thermotoga maritima genome

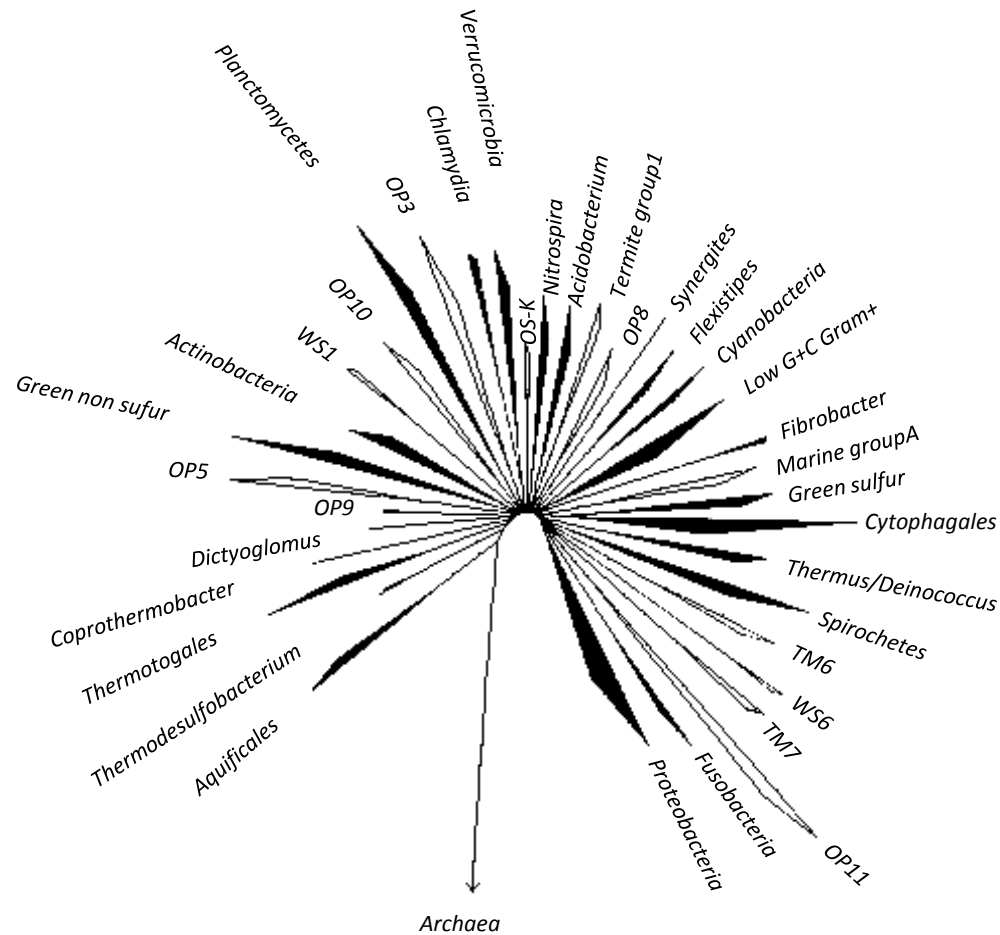


Taxonomic affinity:

- Bacterial
- Archaeal
- Eukaryotic

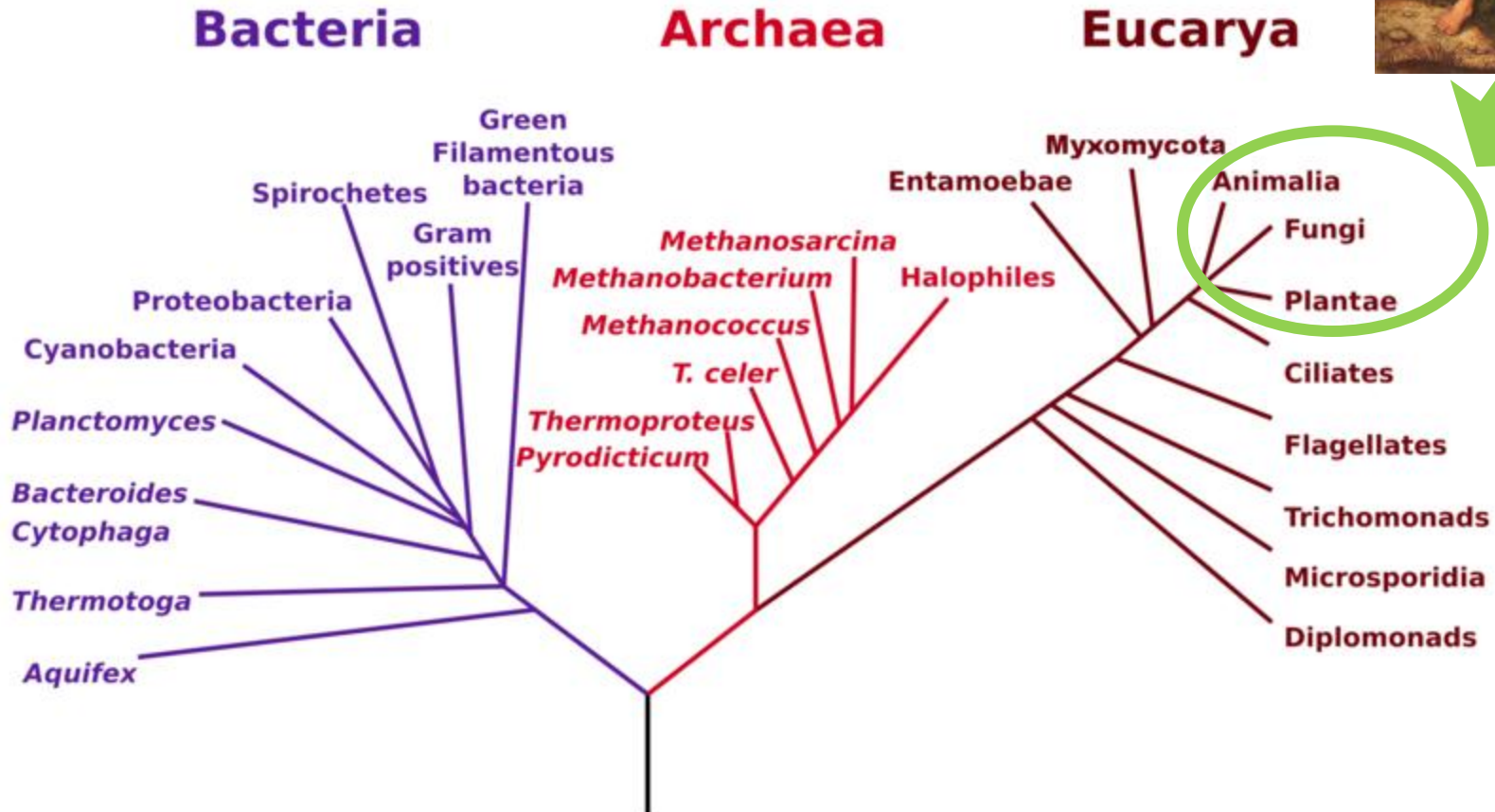
Mais...

Discontinuité évidente au niveau des phyla



Seul entité pertinente ?

Apparition de la sexualité et de l'espèce (si elle existe)



Pas le même temps

Macro



Temps de division
Qq jours à 20 ans



Durée de vie
Qq jours à 1000 ans

Micro



Temps de division
20 mn à 3000 ans



Durée de vie
infini

Individu versus population

Cellule planctoniques => individu **et** population



Filament => individu **ou** population



Biofilm => ?

continuum



Individu/population comment mesurer?

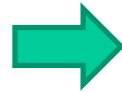
Nombre de cellules?

Copie d'ADN?

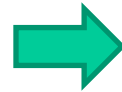
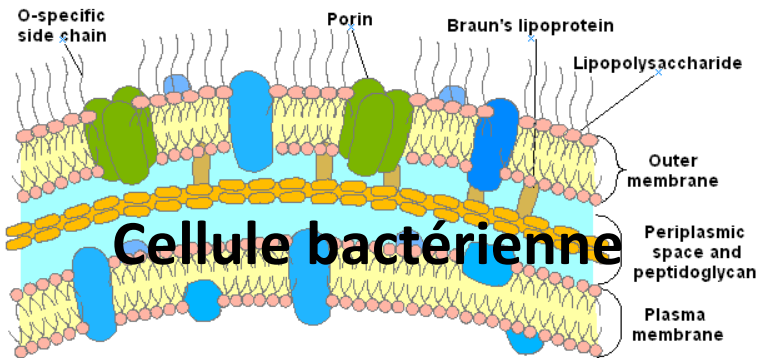
Biovolume?

- Cellule
- Colonie
- Ecosystème

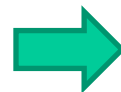
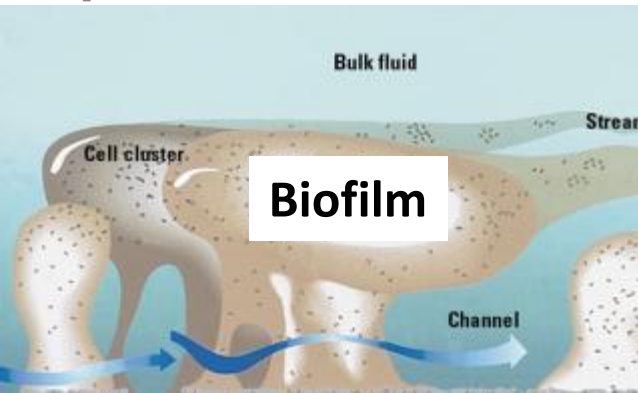
Limite de l'organisme, de l'individu ?



Facile



Moins facile à cette échelle

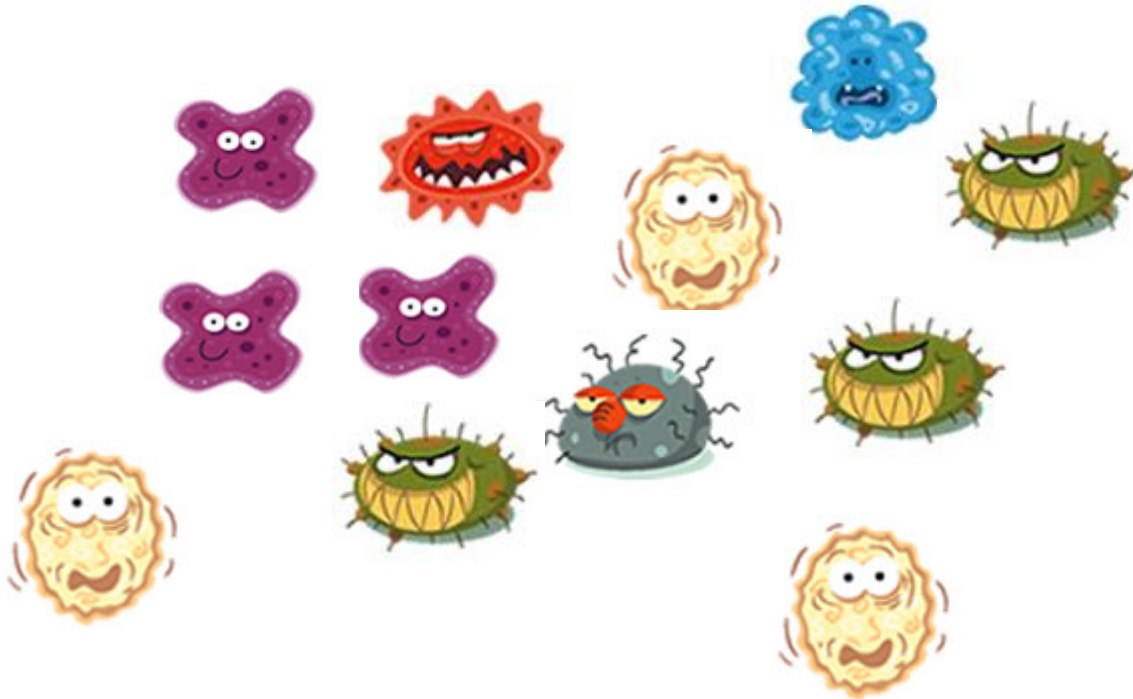


EPS, enzyme extracellulaire,
ADN extracellulaire

impossible

Conséquences:

Comment mésuser la richesse spécifique?



Conséquences:

Comment étudier les interactions avec des continuum?

Ce ne sont jamais des interactions entre 'espèces' mais entre individus

C'est-à-dire des interactions uniques qui n'ont jamais existées et qui n'existeront plus jamais



Conclusion

Pas d'espèce que des individus

Pas de frontière entre individu et population

Pas de synchronisation entre différents 'individu/population'

“... the ultimate scientific goal of biological classification cannot be achieved in the case of bacteria”

Roger Y. Stanier, 1963

La microbiologie qui fait quoi?

Retour à l'écosystème

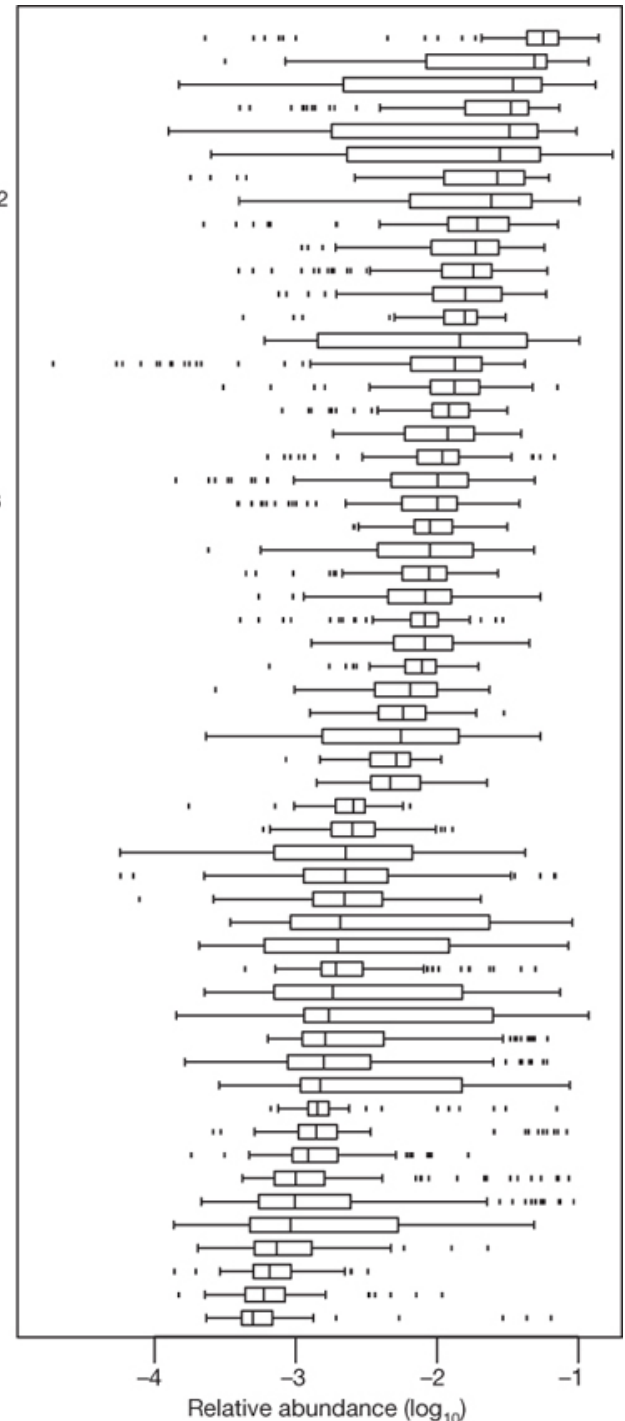


Exemple : écosystème digestif humain

Fréquence des 57 phylotypes les plus abondants

Notion d'espèces 'core'

Bacteroides uniformis
Alistipes putredinis
Parabacteroides merdae
Dorea longicatena
Ruminococcus bromii L2-63
Bacteroides caccae
Clostridium sp. SS2-1
Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482
Eubacterium hallii
Ruminococcus torques L2-14
Unknown sp. SS3 4
Ruminococcus sp. SR1 5
Faecalibacterium prausnitzii SL3 3
Ruminococcus lactaris
Collinsella aerofaciens
Dorea formicigenerans
Bacteroides vulgatus ATCC 8482
Roseburia intestinalis M50 1
Bacteroides sp. 2_1_7
Eubacterium siraeum 70 3
Parabacteroides distasonis ATCC 8503
Bacteroides sp. 9_1_42FAA
Bacteroides ovatus
Bacteroides sp. 4_3_47FAA
Bacteroides sp. 2_2_4
Eubacterium rectale M104 1
Bacteriodes xylanisolvans XB1A
Coprococcus comes SL7 1
Bacteroides sp. D1
Bacteroides sp. D4
Eubacterium ventriosum
Bacteroides dorei
Ruminococcus obeum A2-162
Subdoligranulum variabile
Bacteroides capillosus
Streptococcus thermophilus LMD-9
Clostridium leptum
Holdemania filiformis
Bacteroides stercoris
Coprococcus eutactus
Clostridium sp. M62 1
Bacteroides eggerthii
Butyrivibrio crossotus
Bacteroides finegoldii
Parabacteroides johnsonii
Clostridium sp. L2-50
Clostridium nexile
Bacteroides pectinophilus
Anaerotruncus colihominis
Ruminococcus gnavus
Bacteroides intestinalis
Bacteroides fragilis 3_1_12
Clostridium asparagiforme
Enterococcus faecalis TX0104
Clostridium scindens
Blautia hansenii

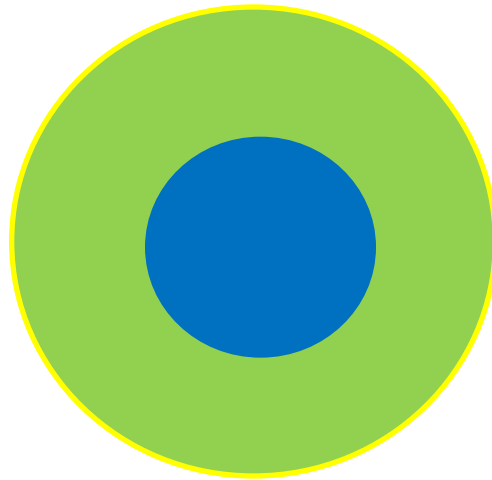




Pan species => espèces parfois présentes



**core species => espèces toujours présentes
abondance variable**



Quel grain pour l'analyse



Ecosystem

Phylogenetic groups

Protein

Ecotype

Species

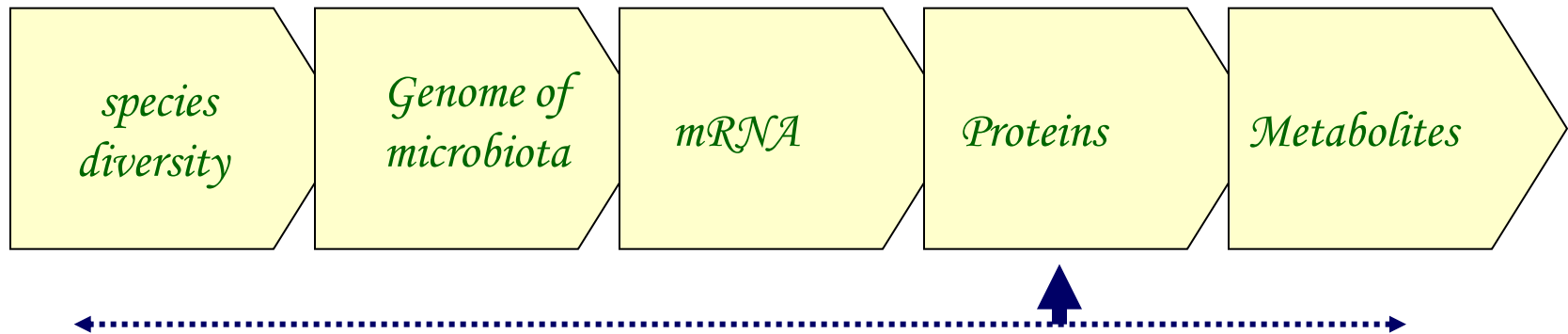
Housekeeping gene
16S rDNA

Strain

Génome



Quel grain pour la stabilité ?



Ce que l'on sait...

- Il n'y a pas d'écosystèmes microbiens simple (sauf rare exceptions)
 - laboratoires, pathologies, *Photobacterium*-nematode, *Vibrio*-méduse)
- On ne sait pas simplifier un écosystème microbien
- Importance de la diversité
- Les écosystèmes microbiens sont dynamique mais stable fonctionnellement
- Les ADNr 16S (phylotypes) sont liés à un environnement plus qu'à une fonction

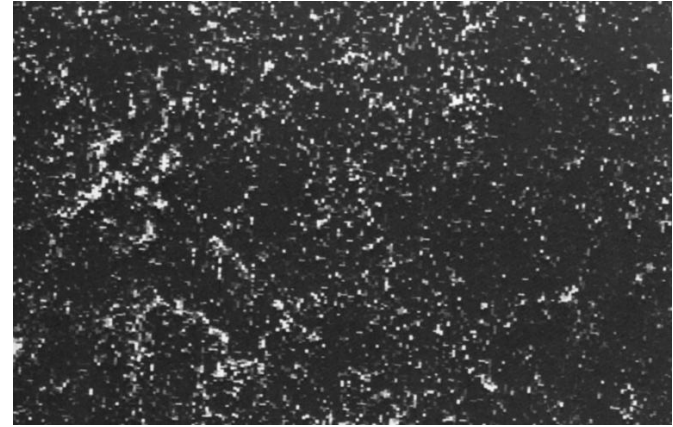
Questions ouvertes...

- L'écosystème microbien est une "autre planète" que l'espèce en souche pure
- Les cultures mixtes reconstituées font partie de la planète "souches pures"
- Comment mesurer les interactions
- Quel grain pour l'analyse ?
 - 16S, flux de gènes, etc.
- Genèse et maintien de la diversité
 - virus
 - autres
- limite de la totipotence
- turn-over du vivant
- nombre de gènes versus nombre de contextes cellulaires

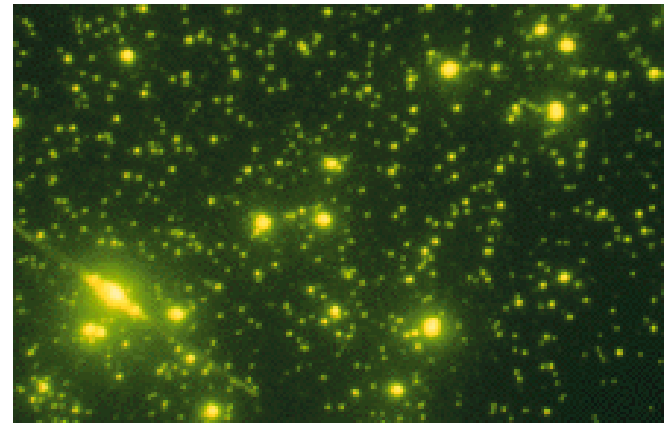
Ambition et arrogance

(d'après Tom Curtis)

- $\sim 10^{21}$ étoiles dans l'univers
- $\sim 10^{30}$ bactéries dans le sol
- $\sim 4 \times 10^{11}$ étoiles par galaxie
- $\sim 10^{18}$ bactéries dans une station d'épuration
- Les bactéries sont plus compliquées que les étoiles ?!



Millions de galaxies à 10^9 années lumières



Virus et bactéries marines