

Les outils de la biologie moléculaire pour l'analyse microbiologique des boues activées

La biologie moléculaire est devenue incontournable dans l'étude des processus biologiques impliqués dans le traitement des eaux résiduaires. Cet article présente les outils couramment utilisés aujourd'hui pour caractériser les populations microbiennes des boues activées, apportant des informations essentielles à la compréhension et à l'optimisation du fonctionnement des stations d'épuration.

Longtemps, l'étude des stations d'épuration s'est limitée au suivi des données physico-chimiques en entrée et en sortie de l'installation, considérant le bassin biologique comme « une boîte noire » où avaient lieu des réactions chimiques mal comprises, réalisées par des micro-organismes non identifiés. La microbiologie des boues activées a permis de lever de nombreuses zones d'ombre sur la nature des réactions existant dans le bassin biologique et le rôle des micro-organismes présents. Avec l'arrivée de la biologie moléculaire, de nouvelles informations capitales ont été apportées, notamment sur la relation identité/fonction des micro-organismes, améliorant encore notre connaissance des mécanismes de dépollution mis en jeu au sein des stations d'épuration.

Pour caractériser l'aptitude des boues activées à traiter un type de polluant, le microbiologiste doit répondre à plusieurs questions dont les principales sont : qui, combien, comment ? Les méthodes de microbiologie traditionnelles, dites pasteuriennes, ne répondent que très imparfaitement à ces questions. L'identification et le dénombrement des micro-organismes se font par microscopie sur des critères morphologiques ou de coloration, ou encore par tests biochimiques après isolement et culture sur boîtes de Petri ou en milieux liquides. Or, la très grande majorité des micro-organismes est incultivable sur ces milieux car les facteurs nécessaires à leur croissance restent inconnus. De plus, ces méthodes requièrent l'isolement du micro-organisme de son milieu naturel et de sa communauté, ce qui biaise forcément l'évaluation de ses activités.

Les méthodes moléculaires, en s'affranchissant de la mise en culture, réduisent énormément les biais des méthodes

1 LEXIQUE

1. **Séquence** : ordre d'enchaînement de nucléotides (voir encadré 2).
2. **ADN** : acide désoxyribonucléique (voir encadré 2).
3. **Régions conservées** : séquences d'ADN identiques retrouvées chez tous les micro-organismes, par opposition aux régions variables.
4. **Flocs** : agglomérats constitués de bactéries et de particules organiques et inorganiques.
5. **Sondes** : petits fragments d'ADN de quelques nucléotides, marqués à une extrémité par un fluorophore (molécule fluorescente).
6. **Ribosomes** : organites intracellulaires permettant la synthèse des protéines.
7. **ARNr** : acide ribonucléique constituant des ribosomes.
8. **Phylogénétique** : se rapporte à la classification des êtres vivants avec pour objectif de rendre compte des degrés de parenté entre les espèces et donc de leur histoire évolutive (ou phylogénie).
9. **Electrophorèse** : méthode d'analyse qui consiste à séparer des molécules chargées (ADN) en présence d'un champ électrique.
10. **Amorces** : petits fragments d'ADN de quelques nucléotides, utilisés par paire et dont les séquences sont complémentaires de celles encadrant le fragment d'ADN à amplifier par PCR.
11. **Agents intercalants** : molécules fluorescentes s'insérant entre les bases de l'ADN.

pasteuriennes. Elles permettent de caractériser les micro-organismes d'un échantillon, qu'ils soient cultivables ou non, dans leur environnement naturel (Huybens *et al.*, 2009). Ces techniques utilisent des séquences¹ d'ADN² spécifiques des micro-organismes cibles afin de les identifier et de les dénombrer. Selon que la séquence ciblée est choisie dans une région très conservée³ des

gènes marqueurs, ou au contraire dans une région très variable, il sera mis en évidence des groupes microbiens très divers, ou bien des micro-organismes très ciblés (espèce ou sous-espèce bactérienne). D'un point de vue pratique, seule une centaine de millilitres de boue activée est nécessaire à la réalisation de dizaines, voire de centaines d'analyses moléculaires. Ces techniques sont donc particulièrement puissantes dès lors que la représentativité de l'échantillonnage est bien assurée.

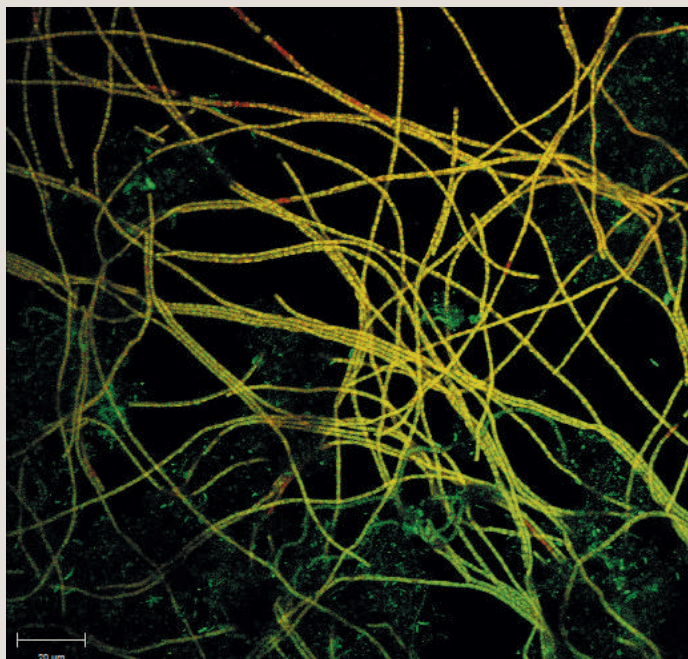
Cet article présente les outils couramment utilisés aujourd'hui pour caractériser les populations microbiennes des boues activées (identification, biodiversité, quantification) en détaillant leurs principes et en donnant quelques exemples d'application en épuration des eaux résiduaires (tableau 1).

Détection et identification des micro-organismes en microscopie

En microscopie classique, il est possible d'étudier la structure des flocs⁴ (taille, morphologie), mais il est très difficile d'identifier les différents micro-organismes présents. Des colorations (Gram, Neisser) permettent d'identifier quelques grands groupes de bactéries, mais déstructurent complètement l'organisation du floc.

La technique FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), qui combine biologie moléculaire et microscopie, présente l'avantage considérable de pouvoir à la fois identifier de manière fiable les micro-organismes

❶ Prolifération filamenteuse de *Thiothrix sp.* au sein d'un floc. Détection simultanée des bactéries totales (sonde EUBmix-FITC) en vert et de *Thiothrix sp.* (sonde G123T-Cy3/G123T-C) en rouge. La couleur jaune est due à la colocalisation des deux marquages.



présents et visualiser leur morphologie ainsi que leur répartition spatiale au sein des flocs. La puissance de cette technique réside dans sa simplicité et sa rapidité de réalisation (quelques heures). Son principe repose sur l'utilisation de sondes⁵ fluorescentes

❶ Principes, objectifs et applications de quelques techniques de biologie moléculaire.

Technique	Principe	Objectif	Exemple d'application	Avantages	Inconvénients
FISH	Marquage fluorescent de l'ARNr	Identification moléculaire et répartition spatiale des micro-organismes	Identification des bactéries filamenteuses	Rapide Possibilité de multiplexage	Microscope à épifluorescence (coût)
PCR	Copie d'un fragment d'ADN cible <i>in vitro</i>	Amplification de l'ADN	DGGE (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)	Rapide Grand nombre d'échantillons traités	Réaction pouvant être inhibée par des impuretés dans les extraits d'ADN
DGGE	Électrophorèse en gradient de dénaturant	Étude de la biodiversité des micro-organismes (possibilité d'identification ultérieure des espèces dominantes)	Comparaison de différents types de stations d'épuration Impact de conditions particulières sur les micro-organismes	Grand nombre d'échantillons traités	Lourdeur des expérimentations
qPCR	Amplification quantitative de l'ADN	Quantification des micro-organismes		Rapide Plusieurs méthodes de détection disponibles	Seuil de quantification souvent limité aux populations présentes à plus de 10 ² cellules/mL de boues
Séquençage	Lecture de l'information génétique	Identification moléculaire des micro-organismes	Inventaire moléculaire de tous les micro-organismes présents et/ou de leurs fonctions associées	Approche exhaustive	Lourdeur des expérimentations et de l'analyse des données Coût élevé

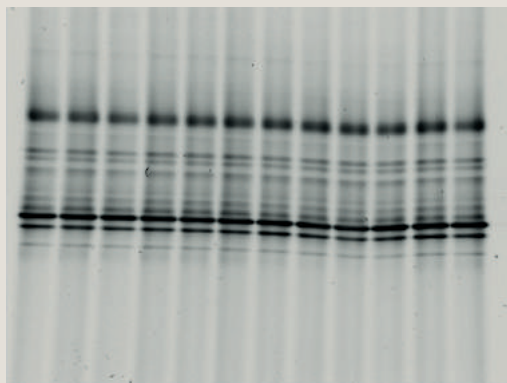
② POUR EN SAVOIR PLUS SUR L'ADN

L'ADN, support de l'information génétique, est constitué de deux brins contenant chacun plusieurs milliards de nucléotides. Chaque nucléotide est constitué : d'un acide phosphorique, d'un sucre (le désoxyribose), et d'une base azotée qui peut être l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T) ou la cytosine (C). La molécule d'ADN adopte une structure en double hélice ; les deux brins sont reliés entre eux par des liaisons établies entre bases azotées dites « complémentaires » : l'adénine d'un brin est reliée à la thymine de l'autre brin par deux liaisons, la guanine d'un brin est reliée à la cytosine de l'autre brin par trois liaisons.

► complémentaires de séquences spécifiques de l'ARN des ribosomes⁶ (ARNr⁷) des cellules ciblées. Après traitement chimique de la membrane des cellules, les sondes vont pouvoir y entrer et se fixer sur leurs cibles. La fluorescence émise est alors observable avec un microscope dit « à épifluorescence » (figure ①). Il est possible d'utiliser plusieurs sondes simultanément sur un même échantillon, marquées avec des fluorophores différents (multiplexage). Pour identifier un micro-organisme, il est toutefois nécessaire qu'une sonde spécifique existe, ce qui n'est pas toujours le cas, même si plus de 2500 sondes ont été développées à ce jour (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>).

Grâce à cette technique, il a été mis en évidence que les AOB (*Ammonia Oxidizing Bacteria*) et les NOB (*Nitrite Oxidizing Bacteria*), bactéries réalisant respectivement la première et la deuxième étape de la nitrification, étaient spatialement proches dans le floc, rendant les produits de la première réaction rapidement utilisables comme substrats pour la seconde (Mobarry *et al.*, 1996).

② Gel DGGE montrant la stabilité de la biodiversité des bactéries nitrosantes (AOB) d'une station d'épuration sur plusieurs semaines.



Chaque colonne correspond à un profil, soit un prélèvement. Chaque bande d'ADN (en noir) correspond à au moins une espèce de bactérie nitrosante.

En routine, le FISH se révèle très utile pour identifier rapidement et simplement les bactéries filamenteuses, qui peuvent être responsables de dysfonctionnements biologiques en stations d'épuration (foisonnement des boues et/ou moussage). En effet, les techniques classiques de coloration ne permettent pas toujours de le faire avec certitude (variabilité des colorations, expérience de l'observateur). Il est alors possible de mettre en place sur site des solutions préventives ou curatives adaptées à la bactérie incriminée.

Étude de la biodiversité microbienne

La technique FISH ne permettant de visualiser simultanément qu'un nombre limité d'espèces différentes sur un même échantillon, les études de diversité microbienne font généralement appel à d'autres techniques appelées « techniques de typage moléculaire ». Dans cette approche, les cellules sont lysées, leur ADN est purifié et les gènes d'intérêt sont amplifiés par PCR (encadré ③). Le plus souvent, les gènes ciblés codent pour des ARNr microbiens et permettent une identification phylogénétique⁸ des espèces. Il peut aussi s'agir de gènes dits « de fonction », codant pour des enzymes importantes pour les réactions biochimiques de dépollution comme celles intervenant dans la nitrification ou la dénitrification. Les produits de PCR obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse⁹ dans une matrice de polymères.

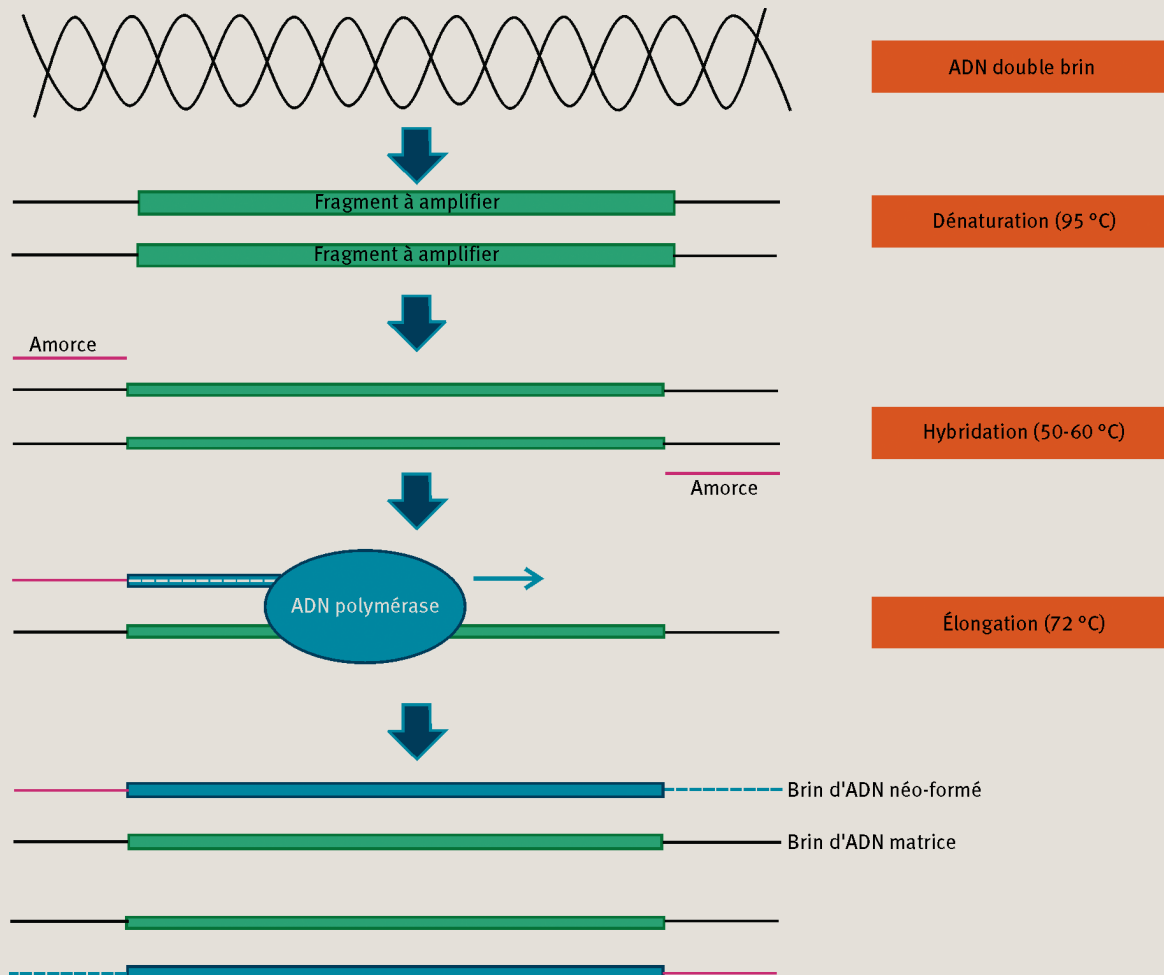
Une de ces techniques, la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), est un procédé d'électrophorèse sur gradient de dénaturants chimiques qui permet d'observer les différences de mobilité de fragments d'ADN de même taille, mais de séquence différente. Sous l'effet d'un champ électrique, les produits de PCR migrent dans le gel et rencontrent des concentrations en dénaturants de plus en plus importantes, entraînant la dénaturation progressive de leurs brins d'ADN selon leur composition en bases GC et AT (encadré ②). L'abondance des bandes sur le profil électrophorétique obtenu reflète la biodiversité de la communauté pour les micro-organismes considérés, chaque bande correspondant au moins à une espèce cible (figure ②). En découpant les bandes sur le gel et en réamplifiant par PCR l'ADN qu'elles contiennent, il est également possible de connaître l'identité du micro-organisme correspondant après séquençage. (cf tableau ① et partie « séquençage »). La DGGE reste lourde à mettre en œuvre car elle nécessite au moins deux jours de manipulations, depuis l'extraction d'ADN jusqu'à la révélation des fragments d'ADN du gel sous illumination UV. De plus, l'identification des espèces est longue car elle fait appel aux techniques de séquençage décrites ci-dessous. En revanche, elle présente l'avantage de pouvoir visualiser jusqu'à une trentaine d'espèces en une seule fois et peut être mise en œuvre sur plusieurs dizaines d'échantillons en parallèle.

La biodiversité des bactéries nitrifiantes, qui assurent la transformation de l'ammoniaque en nitrates au sein du bassin biologique, est très étudiée. Cette technique a permis de montrer que des espèces nitrifiantes différentes se développaient dans les stations d'épuration des

③ LA PCR : ÉTAPE D'AMPLIFICATION DE L'ADN AVANT ANALYSE

La technique PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permet de reconnaître et d'amplifier un fragment d'ADN spécifique, parmi les millions de gènes d'un micro-organisme et les milliards de micro-organismes d'un échantillon, en quelques heures seulement. La réaction PCR consiste en une succession de réactions chimiques appelées « cycles », chacun contenant trois étapes (figure ③) : la dissociation des brins d'ADN (à 95 °C) ; l'hybridation spécifique des amorces¹⁰ aux deux extrémités de la séquence à amplifier (entre 50 et 60 °C) ; l'élongation des brins d'ADN à partir de chaque amorce grâce à l'action de l'ADN polymérase (à 72 °C). Cet enzyme va synthétiser de nouveaux brins d'ADN en assemblant les nucléotides par complémentarité avec les brins d'ADN matrice. Le nombre de copies de l'ADN cible est doublé à chaque cycle. Au bout de trente cycles, on obtient donc théoriquement 2^{30} copies du fragment d'intérêt, soit plusieurs milliards.

③ Principe de la PCR. Un seul brin d'ADN est représenté pour l'étape d'élongation.



eaux usées urbaines et industrielles, en fonction principalement de la concentration en ammonium de l'influent (Kreuzinger *et al.*, 2003).

En routine, la DGGE peut être utilisée, par exemple, pour évaluer l'impact de conditions de fonctionnement particulières d'une station d'épuration sur une communauté microbienne donnée. Les bactéries nitrifiantes (AOB) étant très sensibles aux conditions environnementales (température, variation de charge, toxique), la nitrification peut être facilement impactée et les niveaux de rejet en sortie de station non respectés.

Inventaire des micro-organismes présents dans les boues

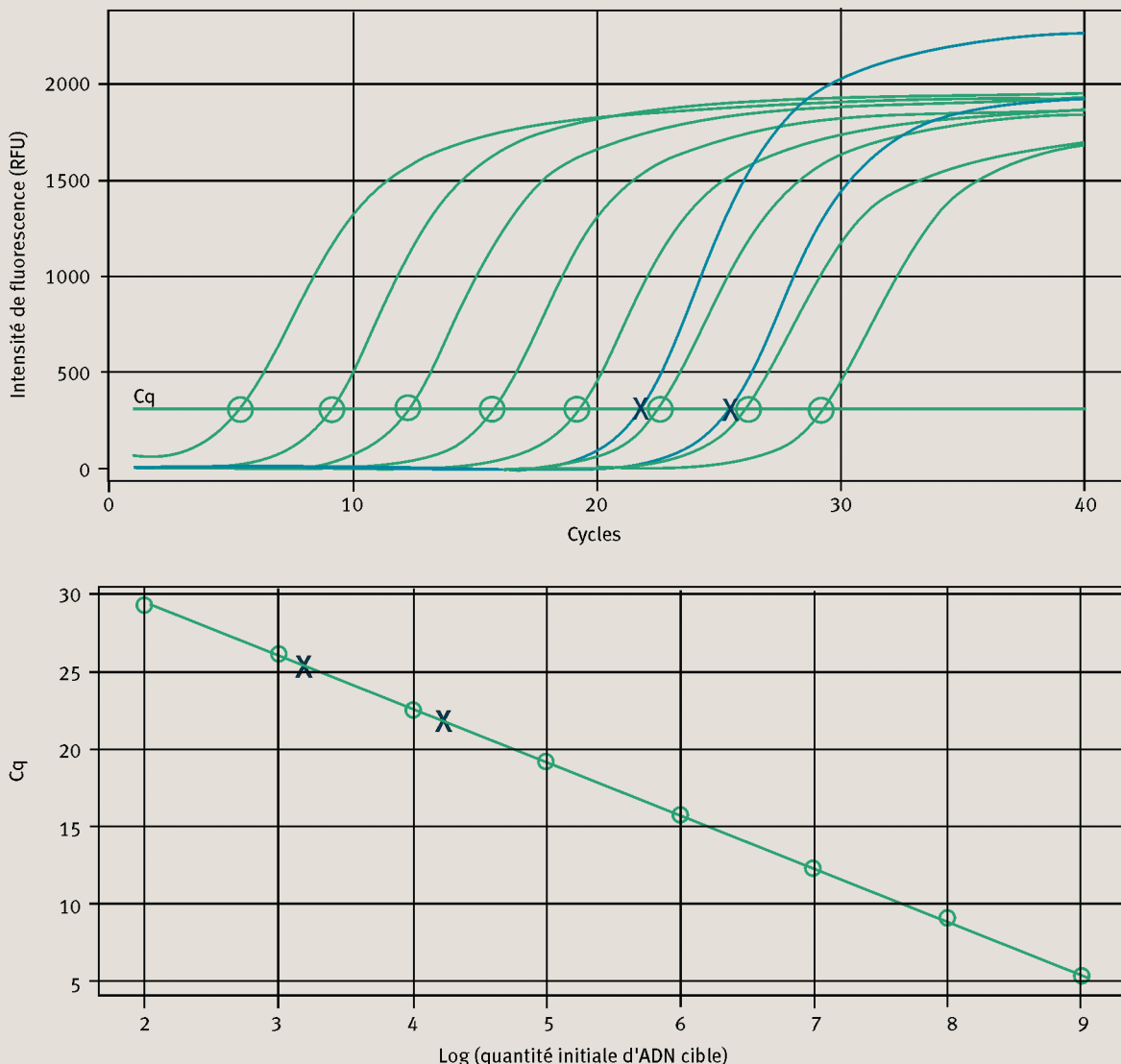
Le séquençage permet, à partir d'une séquence cible d'ADN, de retrouver l'identité du micro-organisme correspondant après comparaison avec une base de

données. Il est utilisé pour réaliser l'inventaire des espèces ou des fonctions potentielles d'un écosystème comme les boues activées par exemple.

Le séquençage selon la méthode originale de Sanger a été mis au point dans les années 1970. Ce fut une révolution dans le domaine de l'identification des micro-organismes. Cependant, la limitation de cette technique tenait principalement à sa faible capacité de lecture et à sa lenteur : il aurait fallu en effet plusieurs dizaines d'années à un séquenceur fonctionnant jour et nuit pour décrypter les millions de bases d'un génome bactérien. Aussi, le nombre de séquences analysables n'était que de quelques centaines et les inventaires réalisés sur des boues activées ne permettaient d'observer que les espèces présentes à plus de 10^8 cellules par millilitre, c'est-à-dire représentant quantitativement moins de 1 % de la communauté. Avec cette approche, les bactéries nitrifiantes, présentes souvent à des concentrations

4 Quantification des bactéries filamenteuses du type *Microthrix parvicella* en qPCR.

En haut, détermination des valeurs de Cq. En bas, comparaison des valeurs de Cq des échantillons (X, en bleu) à celles de la gamme étalon (O, en vert).



de 10^6 à 10^8 cellules par millilitre de boues activées, n'étaient pas détectées.

Depuis 2005, avec le séquençage haut-débit dit « de nouvelle génération », la même opération est dorénavant réalisée en quelques heures seulement et le nombre de séquences obtenues s'élève à plusieurs millions. Toutefois, le traitement du grand nombre de données générées est lourd, il nécessite des connaissances approfondies en bioinformatique et plusieurs jours d'analyse.

Cette technique a permis de grandes avancées dans la connaissance phylogénétique des bactéries filamenteuses. On s'est en effet rendu compte que des bactéries très proches morphologiquement étaient en fait très éloignées phylogénétiquement et avaient des fonctions et activités différentes (Wagner et Cloete, 2002).

L'apport de cette technique est capital : il est désormais possible d'inventorier les différents micro-organismes présents dans un échantillon de boues activées sur une

seule plaque de séquençage (de moins d'1 cm²), ou d'avoir accès à leur activité métabolique à un instant donné.

Quantification des micro-organismes

Pour améliorer la compréhension des procédés, les données obtenues à l'aide des outils moléculaires doivent être quantitatives. L'outil le plus utilisé aujourd'hui est la PCR en temps réel (qPCR), technique précise, rapide, et facilement automatisable. Le principe est le même que celui d'une PCR classique (encadré 3), à la différence que l'amplification du fragment d'ADN est mesurée en continu à l'aide d'agents intercalants¹¹ de l'ADN double brin ou de sondes fluorescentes. Cette méthode nécessite la réalisation d'une gamme étalon à l'aide de solutions d'ADN cible de concentrations connues. Le nombre de copies d'ADN cible étant doublé à chaque cycle, la fluorescence augmente de la même façon. Le logiciel détermine alors pour chaque échantillon un « seuil

de quantification » (Cq), correspondant au nombre de cycles pour lequel la fluorescence devient significativement différente du bruit de fond. Comparée à celles de la gamme étalon, la valeur de Cq permet d'estimer la quantité d'ADN cible de l'échantillon correspondant (figure 4). Le nombre de micro-organismes d'intérêt peut ensuite être déduit en connaissant le nombre moyen de copies du gène ciblé par cellule (www.mmg.msu.edu).

Cette technique a permis de quantifier dans les boues activées des micro-organismes appelés AOA (*Ammonium Oxidizing Archaea*), archées capables de réaliser la première étape de la nitrification (Park *et al.*, 2006). Développée à l'origine pour quantifier les séquences d'ADN et dénombrer ainsi les micro-organismes, cette technique est actuellement adaptée à la quantification des ARN afin de quantifier l'expression de gènes d'intérêt et approcher l'activité des micro-organismes.

En routine, la qPCR peut être utilisée, par exemple, pour suivre l'impact d'un traitement curatif (chloration, sels métalliques) sur la quantité de bactéries filamenteuses présentes dans les boues activées, et de pouvoir ainsi conclure sur son efficacité ou bien adapter le dosage sur site.

Conclusion

La liste de méthodes présentée ici est loin d'être exhaustive. De nombreuses autres techniques moléculaires sont utiles à l'analyse microbiologique des boues activées. Les

progrès sont très rapides et ces techniques en constante évolution, devenant au fil des années plus rapides, plus efficaces et moins coûteuses. De plus, la plupart des techniques utilisées aujourd'hui peuvent être automatisées pour traiter rapidement un grand nombre d'échantillons. Cependant, la microbiologie des boues activées reste un domaine où de grandes inconnues subsistent, à cause de la complexité de ce milieu, tant au niveau des processus biologiques que des micro-organismes impliqués. Aujourd'hui, le couplage systématique des méthodes de microbiologie moléculaire à celles du génie des procédés permet toutefois de mieux comprendre et optimiser les procédés de traitement des eaux résiduaires. ■

Les auteurs

Lauriane JUZAN et Jean-Jacques PERNELLE

Irstea, UR HBAN, Hydrosystèmes et bioprocédés,
1 rue Pierre-Gilles de Gennes, CS 10030,
92761 Antony Cedex

✉ lauriane.juzan@irstea.fr

✉ jean-jacques.pernelle@irstea.fr

Patrick DABERT

Irstea, UR GERE,
Gestion environnementale et traitement biologique des déchets,
17 avenue de Cucillé, CS 64427,
35044 Rennes Cedex

✉ patrick.dabert@irstea.fr

QUELQUES RÉFÉRENCES CLÉS...

- 📄 HUYBENS, N., MAINIL, J., MARLIER, D., 2009, Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes, *Annales de Médecine Vétérinaire.*, n° 153, p. 112-128.
- 📄 KREUZINGER, N., FARNLEITNER, A., WANDL, G., HORNEK, R., MACH, R., 2003, Molecular biological methods (DGGE) as a tool to investigate nitrification inhibition in wastewater treatment, *Water Science and Technology*, n° 47, p. 165-172.
- 📄 MOBARRY, B.K., WAGNER, M., URBAIN, V., RITTMANN, B.E., STAHL, D.A., 1996, phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(6), p. 2156-2162.
- 📄 PARK, H.D., WELLS, G.F., BAE, H., CRIDDLE, C.S., FRANCIS, C.A., 2006, Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(8), p. 5643-7.
- 📄 WAGNER, A.M., CLOETE, E.T., 2002, 16S rRNA sequence analysis of bacteria present in foaming activated sludge, *Systematic and Applied Microbiology*, 25(3), p. 434-439.

► Consulter l'ensemble des références sur le site de la revue www.set-revue.fr