



Colloque AdebioTech

BiomInnov

Compte- rendu

**La biologie moléculaire appliquée à l'Environnement et au service
de l'innovation industrielle**

Ludivine GUERINEAU, Chargée de missions, AdebioTech

Sous la direction de :

Francis GARRIDO, Responsable de l'Unité BioGéochimie Environnementale et Qualité de l'Eau au sein de la Direction Eau, Environnement et Ecotechnologies, BRGM

Et la coordination de :

Danielle LANDO, Vice-présidente, AdebioTech

Avec le soutien de :



Table des matières

Introduction	3
Conférence plénière : Implication des approches de biologie moléculaire pour le traitement biologique des polluants.....	4
Session 1 : Innovations et transferts appliqués à la biologie moléculaire au service de l'Environnement : les mécanismes de mise en œuvre en France	4
Session 2 : Nouvelles applications de la biologie moléculaire au service de l'air	10
Session 3 : Nouvelles applications de la biologie moléculaire au service des sols et des environnements profonds.....	13
Session 4 : Nouvelles applications de la biologie moléculaire au service de l'eau	16
Mise en perspectives	19
Discours de clôture	20
Conclusion du colloque	20

Introduction

Francis GARRIDO, BRGM

Ce colloque a été organisé à la suite d'une interaction étroite entre l'association Adebitech et le BRGM (Bureau de Recherches Géologiques et Minières) sur la thématique des outils de biologie moléculaire appliqués en environnement et au service de l'innovation industrielle.

Le développement de ces outils au cours des dernières années est à l'origine de nombreux sauts technologiques permettant d'envisager aujourd'hui de multiples applications dans le domaine environnemental. Les différents objectifs de cette journée étaient de :

- Dresser un panorama des avancées du savoir-faire dans les domaines de l'eau, des sols et environnements profonds et de l'air.
- Identifier les verrous et les leviers pour améliorer le transfert technologique de ces outils vers des domaines industriels qui peuvent être associés à ces développements technologiques.
- Créer une synergie entre les chercheurs, développeurs, utilisateurs et fournisseurs de service associés à ces outils.

Ce colloque a pu être réalisé grâce à la participation et l'implication des intervenants et organisateurs de sessions et tables rondes, le soutien financier de l'Ademe, de Bertin Technologies, du BRGM, de Ceeram et de Veolia et enfin, les soutiens constants de Biocitech, Sup'Biotech et du Conseil Général de la Seine- Saint- Denis

Cette journée, animée par Valéry Dubois, journaliste scientifique, a attiré de nombreux professionnels issus des différents secteurs publics, parapublics et privés en rassemblant 142 participants, 24 posters représentés et 5 stands (Ceeram/ Biomanda, Genoscreen, Idil, Kallistem et Tecora).

Le graphique 1 illustre la proportion des différents secteurs présents lors de notre colloque où nous pouvons voir une répartition équilibrée entre les secteurs publics, parapublics et privés. Concernant les industriels, les petites et moyennes entreprises (< 250 employés) représentaient près de la moitié des entreprises présentes comme cela est indiqué dans le graphique 2.

Graphique 1 : Répartition des différents secteurs

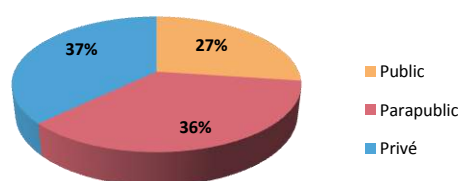
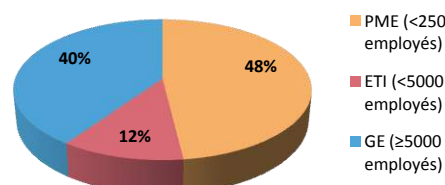


Diagramme 2 : Répartition des industriels en fonction de leur taille



Conférence plénière : Implication des approches de biologie moléculaire pour le traitement biologique des polluants

Timothy VOGEL, *Ecole centrale de Lyon*

La biologie moléculaire est un outil qui permet d'obtenir deux grandes informations sur l'environnement microbien à savoir i) la présence des microorganismes (quelles sont les bactéries présentes ?...) et ii) l'activité de ces derniers (Sont-ils actifs ? Fonctionnent-ils correctement ?...). Ainsi, la biologie moléculaire se caractérise par trois grands types de molécules : i) l'ADN donnant une information sur la présence des microorganismes, ii) l'ARN informant sur leur fonctionnement et enfin iii) les protéines exprimant la réactivité de ces microorganismes.

Les outils de biologie moléculaire (PCR et dérivés, puces à ADN, séquenceurs et –NGS – Nouvelles Générations de Séquenceurs, ...) permettent aujourd'hui de nombreuses applications en environnement même si, comme dans tout environnement naturel, il y a des organismes que ces technologies ne permettent pas de détecter. La technique de séquençage par exemple pose la question du seuil de détectabilité et donc des problèmes de réponses statistiques dus à l'extraction, l'efficacité de cette extraction et des techniques de lyses pas toujours adaptées. Suivant les techniques utilisées, les résultats obtenus sont différents au sein du même échantillon. Que devons-nous faire ? Devons-nous utiliser toujours la même technique pour obtenir des résultats cohérents ? Devons-nous créer des référentiels et des inter-comparaisons ?

L'ensemble des techniques de biologie moléculaire, appelées OMICS permettent d'avoir une analyse globale de la communauté microbienne et de son fonctionnement dans un environnement (eau, sol et air).

Session 1 : Innovations et transferts appliqués à la biologie moléculaire au service de l'Environnement : les mécanismes de mise en œuvre en France

Points importants de cette session:

- Standardisation des outils de biologie moléculaire : chaque étape doit être facilitée, process reproductible pour réaliser des études à grande échelle
- Nécessité d'avoir des référentiels pour permettre une meilleure interprétation des résultats
- Bioinformatique : outil indispensable à l'analyse des résultats, d'où la nécessité d'avoir du personnel qualifié et spécialisé
- Amélioration des transferts technologiques :
 - Amener les chercheurs vers une recherche plus sociétale
 - Développer des partenariats public/privé
- Les structures de transfert technologique doivent être sollicitées dès le début des démarches relatives à la mise en application de ces outils
- Besoin de :

- Communiquer sur les outils
- Former du personnel
- Accompagner le transfert de technologie
- Coûts restent élevés
- Echantillonnage : étape cruciale
- Développement d'indicateurs basés sur des outils de biologie moléculaire: réel besoin pour le diagnostic et le suivi environnemental (car ces outils sont complémentaires aux analyses taxonomiques plus classiques)

Suite à l'introduction par Timothy VOGEL présentant le socle académique de ces outils, il est nécessaire de s'orienter vers les déclinaisons possibles de ces outils car il est parfois difficile pour les utilisateurs de savoir quelles applications nous pouvons envisager.

Stéphanie FERREIRA, *Responsable Recherche, Développement et Innovation Santé Humaine et Environnement chez Genoscreen*

Les outils existent mais il est indispensable pour les industriels que ces outils soient standardisés. L'Outil Moléculaire permet d'obtenir de nombreuses informations à partir d'ADN et d'ARN, molécules présentes chez tous les organismes vivants. Les champs d'applications sont nombreux : santé humaine et animale, agro-industrie, pharmacologie... et depuis peu l'environnement où de nombreuses recherches sont en cours. Genoscreen s'inscrit dans cette démarche en proposant des outils de biologie moléculaire standardisés pour les industriels en plus de proposer des services en laboratoire.

Suite à une réelle demande de la part des chercheurs, Genoscreen a développé une activité de transformation de ces outils en produits de routine (process standardisé, s'adaptant à toutes les espèces, outils reproductibles). Il y a une réelle interaction entre les chercheurs du secteur public et le monde industriel. L'idée est que quel que soit le manipulateur, l'appareillage... la réponse soit identique. Il est indispensable de développer des produits répondant aux besoins des utilisateurs. Chaque étape doit donc être facilitée pour que toute personne, y compris celles qui n'ont pas d'expertise dans le domaine de la biologie, puisse comprendre l'apport de la biologie moléculaire.

Lionel RANJARD, *Directeur de recherche INRA, directeur scientifique de la plateforme GenoSol, INRA Dijon*

Il est important d'avoir des indicateurs et des outils mais, ce qui est indispensable à la diffusion de cette approche, est d'avoir des référentiels qui permettent d'interpréter ces outils et les valeurs obtenues. Depuis le milieu du XXème siècle jusqu'à aujourd'hui, la recherche en

microbiologie environnementale a évolué en passant par l'étude des individus, des populations et des communautés jusqu'à celle des méta-communautés (ensemble des individus microbiens sur une échelle spatiale large voir même à l'échelle du territoire national). Cette évolution saltatoire est due aux évolutions technologiques avec l'arrivée des outils de biologie moléculaire et la bioinformatique.

La bioinformatique permet aujourd'hui de traiter, gérer et organiser les données obtenues avec les outils de biologie moléculaire. L'informatique est à présent un facteur limitant car le coût de ces outils et la quantité de données apportées sont élevés avec une capacité d'analyse restreinte. Il faut savoir affilier les données obtenues, les filtrer en repérant les biais et artéfacts afin d'être sûr d'analyser des données biologiques.

Ces précautions prises, la routinisation de ces outils permet de passer des centaines voire même des milliers d'échantillons à un moindre coût et donc de faire des méta-communautés à grande échelle.

L'évolution technologique de ces dernières années permet de séquencer des centaines voire des milliers d'échantillons en un seul run avec pour contrainte que nous sommes souvent derrière ces technologies. L'avantage est de pouvoir estimer la diversité taxonomique et fonctionnelle d'une communauté microbienne même si seulement une infime partie du milieu environnemental est obtenue. La standardisation de ces outils permet également de faire des études à grande échelle sur la diversité des communautés microbiennes du sol (cartes nationales...) afin d'avoir une meilleure connaissance de l'impact environnemental et de permettre la mise au point d'indicateurs. L'amélioration des transferts technologiques est donc cruciale notamment au niveau du transfert de la recherche vers les applications opérationnelles.

Témoignages sur la mise en place de laboratoires de prestation en environnement qui utilisent la biologie moléculaire

Anne- Laure BLIEUX, *Chargée de projet, GenoBiome*

La structure GenoBiome valorise les outils de biologie moléculaire et les référentiels d'interprétations développés au sein de la plateforme Genosol (UMR Agroécologie, INRA Dijon). Cette structure est un exemple d'amélioration des transferts entre les différents acteurs des sites et sols en valorisant les structures publiques pour le secteur privé via des indicateurs basés sur des outils de biologie moléculaire fiables, robustes et standardisés. Ces outils présentent deux avantages majeurs : ils sont facilement transférables et compréhensibles pour les non-experts en biologie. Les résultats peuvent être présentés sous forme d'Indice de biodiversité ou de radar. Néanmoins, la difficulté reste celle liée à la forme du résultat rendu d'où l'importance de développer des partenariats (ex : travailler avec des agronomes pour mieux connaître les éléments qui favorisent la diversité microbiennes : intrants, travail du sol etc...). L'enjeu est donc de développer des partenariats avec des professionnels de l'agronomie pour ensuite les conseiller afin qu'ils améliorent leurs pratiques agricoles.

Olivier SIBOURG, *Gérant, ENOVEO*

Laboratoire et structure de conseils et d'expertise, Enoveo propose une vision de management des ressources microbiennes via des outils de biologie moléculaire comme un des meilleurs moyens pour dépolluer un sol par exemple. Ainsi, les outils de biologie moléculaire vont donner une information dynamique (information prédictive) de l'évolution d'une communauté de microorganismes contrairement à la chimie qui apporte une information statique.

Témoignages d'organismes de recherche impliqués dans le transfert technologique en biologie moléculaire appliqué à l'environnement

Valérie TANCHOU, *Chef de laboratoire, CEA Marcoule*

Le CEA DSV (Direction des Sciences du Vivant) est une cellule de valorisation accompagnant les chercheurs dans leurs démarches de transfert des technologies (administratives, juridiques, business...). Aujourd'hui, le CEA DSV s'ouvre de plus en plus à l'international notamment grâce à l'apparition de nouveaux domaines de plus en plus spécialisés en environnement.

Les contacts avec les industriels constituent un véritable atout pour développer et élargir leurs réseaux, sachant que le CEA ne peut valoriser ses travaux de recherche à travers des publications scientifiques à l'échelle nationale et internationale. Ainsi le manque de publications constitue un frein dans la recherche de partenariats. Par ailleurs, la notion de temps est un critère à prendre en compte afin de bien définir les attentes de chacun. La réglementation sur les Micro-Organismes et Toxines (MOT) est également un frein considérable car ces derniers peuvent être utilisés en bioterrorisme.

Marina MOLETTA- DENAT, *Chargée de projet, INRA transfert Environnement*

L'INRA Transfert Environnement est une business unit dépendante de l'INRA Transfert, structure privée, reconnue à l'international et adossée au Laboratoire de Biotechnologies Environnemental (LBE- INRA). Son principal but est d'aider à préciser la demande des industriels et d'y répondre en faisant l'intermédiaire entre la recherche académique et l'industrie. Trois grands types de prestations sont proposées, à savoir, i) des prestations standards (analyses et caractérisations), ii) des prestations sur mesure en développant des indicateurs déjà existants ou adaptés à la demande et enfin, iii) des prestations tertiaires pour aider à l'insertion et l'accompagnement de projet pour l'insertion de technologies.

Ainsi l'avantage de ces outils génériques est de répondre concrètement à des besoins spécifiques et à des problèmes comme par exemple la traçabilité géographique. Gérer et prévenir la gestion des ressources microbiennes est donc possible grâce à ces outils.

DISCUSSIONS

Jean PACHOT, *Oroxcell*

Concernant la qualité des sols et leur fertilité, avons-nous un recul suffisant sachant que la cartographie ne permet pas d'enrichir la connaissance ?

Anne- Laure Blieux, *GenoBiome*

Au sujet de la fertilité, le lien est fait par rapport aux connaissances existantes afin d'en tirer le potentiel/ l'abondance des populations microbiennes présentes. Les cartographies en France peuvent être plus ciblées d'une région à l'autre. L'objectif étant bien d'enrichir ces données afin d'avoir un référentiel plus précis et plus adapté.

Maxime DOOMS, *Laboratoire de Génie Civil et Ingénierie Environnementale (LGCIÉ) - INSA Lyon*

Vous appliquez ces outils sur des thématiques à hautes valeurs ajoutées, travaillant dans le domaine de la méthanisation (déchets), quelle est votre opinion par rapport à l'utilisation de ces outils en routine et/ ou suivi dans ce domaine ? Est- ce viable économiquement ?

Olivier SIBOURG, *Enoveo*

Le domaine des déchets n'est pas considéré comme une faible valeur ajoutée et est un marché très important en France, souvent sous- estimé, notamment concernant la méthanisation. Enoveo a des clients travaillant sur les déchets (suivi de la méthanisation) et cela leur arrive d'utiliser des outils de routine. L'information apportée par la biologie moléculaire dans certains domaines va parfois être trop pointue par rapport aux besoins mais dans le cadre de la méthanisation, qui est un domaine très technique, cela est indispensable.

Marina MOLETTA-DENAT, *INRA Transfert Environnement*

Aujourd'hui, ce n'est plus le terme de déchets qui est employé mais celui de résidus et de gisements (à rapprocher de la notion de « mines urbaines »). La terminologie a changé et cela devient de moins en moins des techniques de faibles valeurs ajoutées. La fourchette de tarifs se situe entre 250 et 700€ pour une analyse complète. L'INRA transfert Environnement a peu de demandes concernant le suivi en méthanisation mais beaucoup plus en recherche et développement pour améliorer les procédés existants et en développer des nouveaux. Le trait d'union entre la recherche et l'industrie a soulevé des points importants sur la mise en place de référentiel dans le domaine de la méthanisation.

Témoignages d'utilisateurs de la biologie moléculaire appliquée à l'environnement

Anne-Sophie LEPEUPLE, *Responsable du Pôle Biotechnologie & Agronomie chez Veolia Environnement Recherche et Innovation, VEOLIA*

En ce qui concerne la qualité de l'eau, pour la recherche de pathogènes notamment, les techniques de biologie moléculaire sont utilisées depuis de nombreuses années. Les outils proposés par Veolia ont une réelle valeur ajoutée et sont développés pour le suivi et le développement de procédés.

La première étape pour répondre aux besoins des clients est de trouver un langage commun et comprendre leurs questions afin de les traduire dans un vocabulaire microbiologiste.

Actuellement, Veolia intègre de plus en plus au démarrage des projets les activités de biologie moléculaire pour caractériser les activités microbiennes associées aux procédés développés, et pour optimiser les fréquences d'échantillonnage nécessaire pour ce suivi... Avec cette interaction, Veolia a développé une réelle expertise. Pour chaque procédé, des outils sont développés afin de s'adapter et de répondre à des questions précises. Le séquençage haut-débit est à l'origine d'une mutation au sein des équipes : moins de temps est passé en laboratoire (technicien de laboratoire) mais plus de temps est consacré à l'analyse des données (ingénieur).

Zdravka DO QUANG, *Responsable du Pôle Analyse et Santé au CIRSEE, SUEZ Environnement*

Les outils de biologie moléculaire sont des outils d'analyse incontournables. Ces outils sont très utilisés dans l'évaluation des impacts sur l'écologie microbienne, l'évaluation du risque sanitaire chez les professionnels... L'évolution de la PCR et son usage populaire ont entraîné une baisse des coûts (qui restent malgré tout élevé) rendant le marché beaucoup plus concurrentiel. Il est ainsi nécessaire d'avoir de bonnes échelles de reconnaissances, de recruter des experts pour continuer à développer cette compétence. Cela devrait être entraîné par une réelle demande, une application universelle et accessible.

Témoignage d'un Pôle de compétitivité

Arnaud PARENTY, *Chargé d'affaires, Pôle de compétitivité TEAM²*

Le pôle de compétitivité TEAM² a pour objectifs de rassembler les différents acteurs des sites et sols pollués pour faire évoluer le cadre réglementaire de la valorisation des sédiments et autres déchets. Le développement d'indicateurs est un réel besoin pour le diagnostic et suivi environnemental. Ainsi, il est indispensable de rapprocher les professionnels de ces technologies, les aider à se comprendre pour développer des idées communes. Le dialogue n'est pas toujours simple, d'où la création de groupe de travail commun pour vulgariser ces technologies. Le travail de TEAM² consiste à travailler de part et d'autre, à la fois sur les besoins et les possibilités tout en assurant la coordination entre les professionnels de l'environnement avec l'aide des industriels. Les différentes discussions entre les maîtres d'ouvrage, les bureaux d'études et les scientifiques ont montré un réel besoin d'appropriation, de formation et d'explication de ces technologies avant de pouvoir les commercialiser.

Etude pour identifier les freins à l'utilisation des outils de biologie moléculaire en environnement

Ludivine GUERINEAU, *Chargée de missions, Adebiotech*

Le questionnaire, réalisé en amont de ce colloque, a permis d'identifier les principaux freins au développement et à l'utilisation des outils de biologie moléculaire en environnement à partir de l'avis de 82 professionnels dont 70 avaient une activité en biologie moléculaire. Les résultats obtenus parmi les professionnels de l'environnement ou non, sont corrélés aux témoignages apportés lors de la session 1. De manière générale, les principaux freins identifiés chez les utilisateurs finaux (fournisseurs, prestataires de service et utilisateurs finaux) sont : i) les coûts encore trop élevés du matériel et des consommables, ii) la maîtrise de ces technologies, iii) le manque de professionnels de l'expertise environnementale et enfin, iv) la réglementation. Néanmoins, chez les non-utilisateurs d'outils de biologie moléculaire, qu'ils soient spécialisés ou non en environnement, le principal frein avancé est le manque de connaissances de ces techniques. La communication autour de l'existence de ces outils mais surtout leur valeur ajoutée est sans doute la clé pour lever les autres verrous liés à ces outils. Un compte-rendu précis des résultats sera rendu public.

Session 2 : Nouvelles applications de la biologie moléculaire au service de l'air

Points importants de cette session:

- Amélioration des indicateurs de qualité possibles grâce aux connaissances sur les écosystèmes et aux outils de biologie moléculaire
- Nécessité d'améliorer les méthodes de prélèvement d'échantillons
- Intégration de la préparation d'échantillons dans l'analyse des résultats

Jean-Jacques GODON, *Directeur de Recherche, INRA Narbonne*

La qualité de l'air a beaucoup changé notamment par son anthropisation avec aujourd'hui des données très importantes pour l'air extérieur et pour l'air intérieur. En amont de l'application des outils moléculaires, la particularité de l'air est qu'il est difficile d'échantillonner les microorganismes, de les collecter dans la matrice air et d'avoir des indicateurs pertinents pour pouvoir répondre aux questions de qualité microbiologique.

Pierre AMATO, *Chargé de Recherche, CNRS, Institut de Chimie de Clermont Ferrand*

Il y a une problématique émergente ces dernières années avec une dispersion de microorganismes actifs qui interagissent avec l'environnement. L'écologie microbienne est une discipline qui s'intéresse à l'interaction entre les microorganismes vivants et les processus physico- chimiques de l'atmosphère.

Bioaérosols issus du compostage industriel : étude de leur dispersion par utilisation d'indicateurs microbiens

Nathalie WÉRY, *Chargée de Recherche, INRA Narbonne*

La démarche proposée est une démarche générique de création et de validation d'indicateurs. Pour cela plusieurs questions peuvent être posées, à savoir, un seul indicateur suffit- il ou une combinaison de plusieurs indicateurs est- elle nécessaire ? Aujourd'hui, les connaissances de l'écosystème couplées à l'utilisation d'outils de biologie moléculaire permettent d'envisager des indicateurs de qualité.

Mesures de bioaérosols en air intérieur

Pierre LE CANN, *Enseignant chercheur de Microbiologie, EHESP/INSERM*

La difficulté rencontrée aujourd'hui est la méthode pour mesurer la contamination de l'air intérieur. Il existe plusieurs solutions, soit par un prélèvement d'air, ou bien par des prélèvements plus cumulatifs tels que les poussières.

Différents types de collecteurs sont ainsi utilisés : les bio-collecteurs, les lingettes électrostatiques, les écouvillons, le dustream collector (prélèvement de poussières dans un filtre en nylon) pour ensuite effectuer des analyses moléculaires avec des outils adaptés (qPCR, NGS...). Les années 2000 ont été marquées par le développement d'outils de PCR quantitative pour identifier les moisissures. Cette étude réalisée par les américains de l'EPA (Environmental Protection Agency) a permis de déterminer à partir d'une centaine espèces fongiques une Mold Specific Quantitative PCR pour identifier les espèces fongiques présentes dans les poussières.

Le développement de l'indice moléculaire de contamination fongique est basé sur la qPCR de 36 espèces de moisissures répartie en deux groupes. Le premier est caractérisé par les espèces retrouvées dans un habitat et le second par les moisissures communes à l'extérieur.

Cependant, il y a des différences significatives sur le nombre d'espèces représentées en France par rapport aux Etats- Unis. La représentativité de ces microorganismes doit être approfondie pour être adaptée à notre pays. L'analyse par pyroséquençage permet une analyse bactérienne et non pas fongique, ainsi de nombreuses espèces peuvent être identifiées. Cependant, le recul par rapport à l'utilisation des outils de biologie moléculaire n'est pas assez grand, d'autant plus qu'il faut être extrêmement vigilant à l'utilisation des amorces utilisées pour détecter les moisissures.

DISCUSSIONS

Philippe DUQUENNE, INRS

Avez- vous tenu compte de l'effet des saisons pour les résultats ?

Indirectement oui vu que les prélèvements ont été faits uniquement durant la période hivernale.

Pierre AMATO, CNRS, Institut de Chimie de Clermont Ferrand

Les résultats obtenus par des outils de biologie moléculaire sont corrélés à ce qui se voit à l'œil nu, cela est- il nécessaire de faire ces tests ?

Ces résultats sont importants car il existe deux types de moisissures, les moisissures visibles et celles qui sont invisibles. Par exemple, suite à des dégâts des eaux anciens, des moisissures sont détectées par approche moléculaire bien qu'elles soient invisibles par exemple.

De plus, une corrélation a été faite aux Etats-Unis entre un type de moisissure et le développement d'asthme chez les enfants.

Nathalie GARREC, CSTP

Dans l'étude qui a été présenté, comment les logements ont été sélectionnés ? Une corrélation avec le développement de maladies a- t- elle pu être établie ?

Le service des logements de la ville de Rennes a été sollicité pour savoir s'ils avaient connaissances de logements contenant des moisissures et ensuite la demande s'est faite auprès de connaissances. De plus, ils ont essayé de répartir leurs prélèvements entre les logements individuels ou non, de la ville ou de la campagne. Au vue du faible effectif, aucune corrélation entre les lieux ou le développement de maladies n'a pu être faite. Une étude nationale sur 300 logements va être réalisée au sein desquels il y a des personnes asthmatiques.

David LEJON, Pôle ECOTOX

Avez- vous mesuré des pesticides ou uniquement des moisissures ?

Dans cette étude, les pesticides n'ont pas été mesurés, néanmoins une autre étude spécifique aux pollutions chimiques est en cours pour pouvoir faire une corrélation à la fois sur la présence de moisissures et pesticides et la présence d'enfants asthmatiques.

Outils de détection en ligne des pathogènes aéroportés

Claude VAUCHIER, Responsable Programme Lab-On-Chip pour la Biologie et la Chimie, CEA/Leti

Les objectifs du développement des outils de biologie moléculaire sont de réduire les coûts et rendre simple l'analyse en la décentralisant et donc en l'automatisant. L'idée est d'intégrer, d'automatiser un laboratoire d'analyse et de travailler sur des échantillons d'air.

Pour développer ce genre d'outils génériques, il faut une collecte de l'échantillon, une pré- analyse et un système de détection. Parallèlement, il est nécessaire de bien communiquer, avoir un processus permettant le traitement d'un grand nombre de données et une interface utilisateur la plus simple possible. Aujourd'hui il existe beaucoup d'offres sur les systèmes de laboratoire. De manière générale, les outils pour la collecte de l'échantillon sont à améliorer ainsi que la préparation des échantillons.

Concernant la collecte, les outils actuels ne permettent pas de collecter des espèces nanométriques, ils sont bruyants et très consommateurs d'énergie. D'où le développement d'un système de collecte électrostatique AIR CORONA compatible avec la culture de pathogènes et transportable. Le rendement de collecte est très bon, et aujourd'hui des prototypes vont être livrés à l'INRA.

Pour la préparation des échantillons, il existe des outils mais essentiellement destinés au laboratoire. Deux technologies ont donc été développées à savoir le CEA FlowPad permettant une concentration non spécifique et la lyse de pathogènes couplé au système CEA ALL/SmartDrop pour les étapes de purification d'ADN, de pré-amplification de l'ADN et de qPCR. Ainsi la combinaison de ces deux systèmes permet de développer un outil tout-en-un. BIOCAPTAIR est un dispositif actuellement en phase de test où un module de captation d'air est couplé aux deux systèmes précédents. Concernant les coûts, il est difficile de les estimer de manière précise car certains systèmes ne sont pas encore industrialisés, néanmoins l'ordre de grandeur se situe à plusieurs dizaines de kilos euros.

DISCUSSIONS

Dominique MORIN, BRGM

Combien de temps a-t-il fallu pour le développement de ces outils ?

L'électro-mouillage a demandé plus de dix ans de travail contrairement à l'aéro-collector qui n'en a demandé que trois. Pour l'industrialisation de ces outils, il a été nécessaire de déposer plusieurs brevets (environ vingt-cinq)

Sylvie HALLIER SOULIER, Pall GeneDisc Technologies

Quel est le système de purification utilisé ?

La purification bi-magnétique a été utilisée afin de ne pas avoir de contamination croisée.

Timothy VOGEL, Ecole Centrale de Lyon

Etes-vous au courant des solutions de séquençage Illumina ?

Oui, cependant, pour le séquençage, il est aussi nécessaire de passer par l'étape de préparation des échantillons.

Session 3 : Nouvelles applications de la biologie moléculaire au service des sols et des environnements profonds

Points importants de cette session:

- Intérêt de l'utilisation des échantillonneurs microbiens passifs
- Les outils de biologie moléculaire sont très utiles pour le suivi et le contrôle dans le domaine du traitement des sols pollués et des nappes
- Besoin de faciliter l'interprétation des résultats afin qu'ils soient compris par les non spécialistes en biologie moléculaire (faciliter l'appropriation de ces nouveaux outils par les professionnels de la dépollution).

Abel MAUNOURY, *Ingénieur Recherche – Spécialiste Site et Sols pollués, Total*

Deux angles ont été choisis pour cette session, à savoir le point de vue technique avec trois sujets : la dynamique des populations, la fonction recherchée à exploiter et regarder toutes les méthodologies pour étudier l'environnement. Le deuxième angle était de regarder les intervenants sur le marché : académiques, utilisateurs finaux (entreprises de dépollution) et starts-up.

Bernard OLLIVIER, *Directeur adjoint de l'Institut Méditerranéen d'Océanologie, IRD MOI*

Le fonctionnement des environnements extrêmes est étudié à travers une approche culturelle et moléculaire (pyroséquençage). L'observation du fonctionnement général de la biosphère profonde et le lien avec le domaine de l'exobiologie permet de comprendre le fonctionnement de ces milieux. L'intérêt est de comprendre comment les microorganismes des environnements profonds peuvent être utiles à l'industrie (pétrolière par exemple).

Olivier SIBOURG, *Gérant, ENOVEO*

Tous les outils de biologie moléculaire qui sont élaborés nécessitent beaucoup d'interprétations, partie la plus importante de l'expertise.

Dynamiques de la biosphère profonde par pyroséquençage

Emmanuelle GERARD, *Ingénieure de Recherche en biologie, Institut Physique du Globe Paris*

Il a été mis en avant que la biosphère profonde est très réactive à l'injection de CO₂. Néanmoins, il est encore trop tôt pour affirmer que le CO₂ est responsable d'une perturbation globale de la biosphère. En effet, il est nécessaire de poursuivre les études afin de bien prendre en compte les systèmes d'injection et d'étudier les réactions des microorganismes.

Utilisation d'échantillonneurs passifs pour la caractérisation des communautés microbiennes dans les nappes et sols pollués

Jean-Michel MONIER, *Responsable scientifique et coordinateur du développement de biocapteurs environnementaux, ENOVEO*

Une des principales difficultés est d'arriver à convaincre sur l'apport et la pertinence des outils de biologie moléculaire. Dans les stratégies de dépollution, ces outils apportent une réelle valeur ajoutée grâce à des données pertinentes. Il est nécessaire dans de nombreuses situations, d'adapter

les protocoles car chaque échantillon est différent (présence d'inhibiteurs...). Les outils de biologie moléculaire apportent des réponses sur la communauté microbienne (présence, activité, biodégradabilité...). Dans certains cas, les échantillonneurs microbiens passifs (EMPs) sont utilisés pour représenter une communauté. De manière générale, pour les EMPs, le rendement d'extraction est le même pour une même matrice (eau, sol et air). Ainsi, les données sont reproductibles pour une même matrice et permettent une meilleure représentativité du milieu de prélèvement. Les EMPs permettent une diminution des coûts, une utilisation facile et rapide et une analyse moléculaire quantitative relative.

Utilisation des Outils de Biologie Moléculaire en travaux de dépollution biologique des sols et nappes phréatiques

Alain DUMESTRE, *Directeur Technique, SERPOL*

Les utilisateurs finaux de chez SERPOL ont pour objectifs de dépolluer les nappes phréatiques et les sols à l'aide de procédés biologiques. Ainsi les outils de biologie moléculaire doivent pouvoir être capable de i) leur garantir que les mécanismes en jeu dans les milieux sont bien d'origine biologique et ii) contrôler et suivre les populations bactériennes et leurs fonctionnements. Cependant, les données obtenues par les outils de biologie moléculaire sont très difficiles à interpréter pour les personnes non- formées. En démontrant que les phénomènes biologiques sont actifs, ces outils se révèlent très utiles dans le contrôle et le suivi de dépollution.

DISCUSSIONS

Dominique MORIN, *BRGM*

Avez- vous poussé l'étude jusqu'à évaluer la faisabilité économique d'utiliser les outils de biologie moléculaire ?

Un spécialiste en biologie moléculaire a été embauché et des bioréacteurs ont été créés pour pouvoir produire la souche, le suivi est fait par un partenaire de biologie moléculaire qui la valide. Mais au- delà, il y a un certain blocage lié à l'arrêt d'activité de l'IFP dans le domaine de la bioremédiation et de la gestion des souches microbiennes associées. Il existe d'autres structures qui pourraient être amenées à collaborer avec SERPOL pour résoudre cette difficulté telles que l'ADEME, le BRGM...

Bernard OLLIVIER, *IRD MOI*

Pourquoi avoir choisi le système aérobie pour traiter et non pas anaérobie sachant que dans la biosphère profonde, il y a peu ou pas d'oxygène? Il existe plusieurs approches au niveau national, qu'est- ce qui vous guide ?

Le système aérobie a été choisi pour des questions de facilité au niveau de l'injection de CO₂ mais aussi pour la rapidité. Aujourd'hui, les problèmes de précipitation de fer et de colmatage au niveau des injections nous incitent à nous réorienter vers l'injection d'autres accepteurs comme les nitrates.

Intervenant non communiqué

Peut-on parler de dépollution à partir du moment où la biodiversité microbienne est réduite ?

Alain DUMESTRE, SERPOL

Il existe beaucoup d'études en amont et en parallèle pour expliquer cette diversité microbienne. Néanmoins, les interprétations sont difficiles à exploiter. Le peu d'oxygène injecté est tout de suite utilisé par les microorganismes pour dégrader les polluants. En anaérobiose complète, il y aurait donc à priori une réduction de la diversité.

Jean- Michel MONIER, ENOVEO

Le terme le plus approprié est la pollution transitoire car il existe des populations microbiennes dominantes qui peuvent biaiser la diversité toujours présente.

Abel MAUNOURY, Total

Aujourd'hui il n'existe pas de critère réglementaire qui fixe un bon état microbiologique. Il faut atteindre des conditions acceptables sur le plan sanitaire. Ce n'est pas parce qu'il y a moins de bactéries en teneur détectable qu'il n'y en a pas tout autant dans les 10% non visibles.

Session 4 : Nouvelles applications de la biologie moléculaire au service de l'eau

Points importants de cette session:

- La metatranscriptomique (mesure de l'expression des gènes via les ARN produits), un nouvel outil de suivi des communautés microbiennes présentant de nombreux avantages
- Les techniques d'études de l'ADN environnemental sont limitées à des résultats qualitatifs
- La normalisation de nombreuses méthodes pour la surveillance de la qualité de l'eau potable est un point important pour fixer un nouveau référentiel
- La difficulté de l'interprétation des résultats reste le frein principal.

Anne-Sophie LEPEUPLE, Responsable du Pôle Biotechnologie & Agronomie chez Veolia Environnement Recherche et Innovation, VEOLIA

Théodore BOUCHEZ, Chef de l'équipe BIOMIC, Bioprocédés et biotechnologies microbiennes pour la valorisation des déchets, IRSTEA

L'eau, qui est une ressource et un milieu à préserver, est parfois issue de traitements industriels. Ainsi, l'aspect sécurité est très important car il est impossible de laisser une pollution se répandre dans plusieurs milieux aquatiques.

De nombreuses exigences doivent être mise en œuvre, notamment sur la standardisation et la normalisation des outils, l'organisation, la contextualisation et la gestion de stratégies adaptées.

La Metatranscriptomique, un outil pour le suivi des communautés microbiennes de digesteurs anaérobie en régime stationnaire et dynamique

Grégory MARANDAT, *Doctorant en microbiologie moléculaire, VEOLIA-IRSTEA*

La metatranscriptomique est un outil utilisé au départ en laboratoire pour les premières étapes de manipulation (Préparation des échantillons, PCR, Séquençage...) puis une analyse et un traitement précis des données à l'aide de l'outil informatique. Les résultats obtenus permettent de renseigner sur les bactéries présentes dans le milieu mais aussi de détecter des fonctions bactériennes actives. Cependant, cette technique nécessite beaucoup d'étapes et de temps. De plus, il est indispensable d'avoir du personnel formé en bioinformatique et des infrastructures adéquates.

Néanmoins, les grands avantages de cette méthode sont : i) un ciblage des communautés actives uniquement, ii) des réponses à la fois sur les taxons et les fonctions génétiques, iii) le débit nécessaire est beaucoup moins important qu'en métagénomique et enfin iv) contrairement aux outils de PCR, les données peuvent être ré- analysées. Les analyses taxonomiques sont reproductibles et quantitatives contrairement aux analyses fonctionnelles qui sont semi-quantitatives voire qualitatives.

Il existe aujourd'hui des consortiums qui regroupent les données obtenues par metatranscriptomique. Environ 10% des messages prédits sont interprétés et rattachés à des voies métaboliques connues.

Utilisation des techniques d'ADN environnemental pour la surveillance de l'état écologique des eaux de surface

Nicolas POULET, *Chargé de missions à la Direction de l'Action Scientifique et Technique, ONEMA*

Aujourd'hui, la réglementation européenne va imposer une surveillance des espèces invasives (limitées à cinquante espèces). Deux enjeux sont alors face à nous, i) la restauration et le maintien de la qualité de l'eau et ii) la conservation des espèces en danger et non- conservation des espèces invasives. Différentes stratégies sont donc à mettre en place afin de permettre une surveillance adéquate des milieux (alerte, anticipation et contrôle).

Raphaël CIVADE, *SPYGEN*

L'ADN environnemental (ADNe) peut être cellulaire ou extra- cellulaire. Il existe différentes approches basées sur l'ADNe. Une approche spécifique (eDNA Barcoding) pour la détection d'une espèce cible et pour laquelle Spygen a développé plusieurs salles de laboratoire afin d'éviter le maximum de contaminations. Une approche multi-spécifique (eDNA Metabarcoding) pour la détection de l'ensemble des espèces d'un groupe donné où l'échantillonnage doit être optimisé.

La troisième approche est multi- groupe pour détecter les espèces de plusieurs groupes taxonomiques.

DISCUSSIONS

Jean- Jacques GODON, INRA

Vous présentez des résultats qualitatifs sur la présence/ absence de microorganismes, est- il possible d'imaginer que cela deviennent quantitatif ?

Pour l'instant il faut rester prudent, au vue des premiers résultats, la présence/ absence est déjà une bonne chose, il faut donc être patient pour la suite.

Maxime DOOMS, LGCIE / INSA Lyon

La PCR digitale est un outil qui pourrait vous permettre d'obtenir des résultats semi- quantitatifs, y avez- vous songé pour vous affranchir de certaines contraintes?

Il existe actuellement des tests sur la PCR digitale (Digital droplet) au sein de Spygen pour voir ce qu'ils peuvent apporter (sensibilité...)

Christophe BAGNEUX, ESITPA

Au niveau de l'échantillonnage, avez- vous une idée sur la durée de vie de votre ADN, est- il homogène sur l'environnement ?

Des expérimentations ont été faites sur la durée de vie de l'ADNe sur des :

- *Milieux stagnants reproduits en laboratoire, la durée de vie est de quinze jours (ADN de l'esturgeon)*
- *Milieux courants, une publication américaine est parue récemment sur la détection de l'ADN d'une salamandre. Ce dernier n'est plus détecté au-delà de cinq mètres. Et dès que les individus sont enlevés, le signal disparaît.*

Il est très difficile de travailler sur de l'ADNe car nous ne savons pas exactement sur quoi nous travaillons.

Surveillance de la qualité de l'eau potable : quels nouveaux outils d'analyse pour les traiteurs d'eau - la vision du GWRC (Global Water Research Coalition)

Karine DELABRE, Expert Risques Microbiologiques, GWRC-VEOLIA

Il existe différents niveaux de contrôle : la réglementation (limites et références de qualité), les méthodes par la culture (sur boîte de Petri) et enfin le traitement de l'eau qui bénéficie également d'autres niveaux de contrôle. Depuis quelques années, une démarche préventive basée sur la CCP (agroalimentaire) s'est mise en place et a ainsi généré de nouveaux besoins.

Sophie COURTOIS, Ingénieure projets, GWRC-SUEZ

Les analyses moléculaires grâce à l'utilisation d'outils de biologie moléculaire ont défini un nouveau référentiel avec les espèces totales (contrairement aux référentiels basés sur la mise en culture en boîte de Pétri jusque-là utilisé). Pour pallier à la diversité des méthodes utilisées, il est donc nécessaire de les standardiser. Il existe une réelle dynamique autour de la normalisation. Néanmoins, la difficulté d'interprétation reste encore un point à résoudre afin de pouvoir appréhender ces techniques.

Olivier SIBOURG, *ENOVEO*

Aujourd'hui, ENOVEO est rarement limité sur les problématiques environnementales. Le facteur limitant pour cette structure reste l'extraction des acides nucléiques. Il y a donc un réel travail à faire sur les techniques d'extraction avec un point important qui est le coût. Les échantillonneurs passifs sont donc des biais pour s'affranchir de certaines contraintes.

Les outils de biologie moléculaire deviendront accessibles à partir du moment où ils seront intégrés dans les logiques environnementales. Il y aura alors une réelle intégration de ces demandes dans les projets.

Théodore BOUCHEZ, *IRSTEA*

Il est important de rappeler que beaucoup de verrous technologiques à l'utilisation d'outils de biologie moléculaire ont été levés, mais pour autant il en reste encore. Aujourd'hui, les potentiels de ces outils sont visibles, il faut donc poursuivre le travail sur le développement de ces technologies et sur leur appropriation par les utilisateurs afin qu'ils deviennent des outils de gestion environnementale.

Jean- Jacques GODON, *INRA*,

Les outils de biologie moléculaire sont devenus génériques quel que soit leur domaine d'utilisation (eau, air, sol...). Les problèmes rencontrés se situent soit en amont (améliorer les méthodes de prélèvement des échantillons) soit en aval de leur utilisation (traitement d'un grand nombre de données biologiques) en fonction de la matrice utilisée notamment dans le domaine de l'air.

Francis GARRIDO, *BRGM*

Il serait intéressant de poursuivre l'enquête réalisée en préparation de ce colloque car certaines notions n'ont pas été prises en compte telles que les brevets et les données bibliométriques.

La dynamique initiée du colloque avait pour but de réunir les différents acteurs ce qui est réussi puisque quasiment autant de professionnels du secteur privé que des secteurs public et parapublic sont représentés à ce colloque. Il est aujourd'hui indispensable de travailler sur les différentes parties prenantes du transfert technologique.

Discours de clôture

Catherine TRUFFERT, *Directrice de la Recherche, BRGM*

Cette journée fut très riche, avec une bonne organisation notamment avec une introduction définissant bien les outils de biologie moléculaire et leurs applications. Il y a une communauté assez soudée et un niveau technologique assez avancé permettant des transferts technologiques de toute taille. Il faut continuer à franchir ces verrous collectivement afin de ne pas perdre d'argent et de temps par rapport à la communauté internationale.

Il est nécessaire de démocratiser ces outils pour permettre une meilleure compréhension par les utilisateurs finaux.

L'Etat est également présent, aussi bien auprès de la recherche publique que pour l'entrepreneuriat, notamment à travers le soutien de certaines filières économiques, et dans les initiatives portées par les Instituts Carnot. Il est indispensable de construire des filières d'avenir.

Conclusions du colloque

Points qui sont à améliorer :

- Insuffisance des interfaces publiques/ privées
- Nécessité de former les professionnels de l'environnement en biologie moléculaire
- Communication sur le service rendu par les outils de biologie moléculaire
- Amélioration des étapes :
 - En amont avec l'échantillonnage et la validation des méthodes
 - En aval avec l'interprétation des résultats obtenus grâce à des outils de bioinformatique très performants
- La standardisation et l'automatisation des outils de biologie moléculaire

Points positifs de ce colloque :

- Un réel socle scientifique avec une communauté académique experte
- Des outils de biologie moléculaire précieux pour le suivi et le contrôle des milieux environnementaux
- Des structures de conseils et de transfert technologiques désireuses de suivre des projets dès leur commencement
- Une réelle volonté et un besoin de la part des utilisateurs professionnels d'être entourés d'experts