



Muséum
national
d'Histoire
naturelle

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

Responsables : Dr. Fabien JOUX (UPMC) / Pr. Cécile BERNARD (MNHN)

Chers collègues,

Le parcours de Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé » est une formation proposée au sein du Master de l'UPMC « Biologie Moléculaire et Cellulaire » spécialité « Microbiologie » et du Master du MNHN « Evolution Patrimoine Naturel et Sociétés » spécialité « Mécanismes du Vivant et Environnement ».

Cette formation orientée à la fois recherche et professionnelle vise à répondre aux demandes grandissantes des laboratoires académiques et des entreprises dans des domaines variés comme la recherche fondamentale en écologie microbienne, la valorisation des microorganismes dans l'industrie, les écotecnologies, l'évaluation du risque sanitaire dans l'environnement, le diagnostic environnemental, l'analyse de l'anthropisation des milieux ...

Cette deuxième année de master se déroule en deux parties : un enseignement théorique et pratique de septembre à mi janvier et la réalisation d'un stage en laboratoire ou dans une entreprise de mi-janvier à mi-juin 2018. Le stage de master 2 doit permettre aux étudiants de se familiariser avec une démarche scientifique (faire un bilan des connaissances, identifier les problèmes à résoudre, élaborer des hypothèses, définir un plan d'expérience, mettre en œuvre un protocole, interpréter et discuter des résultats) et de favoriser leur insertion professionnelle.

La durée totale du stage ne doit pas excéder 6 mois. Les étudiants sont gratifiés sur la durée totale de leur stage suivant les règles en vigueur (3,66 € par heure de présence effective en 2017).

L'étudiant aura à réaliser durant la première partie de son enseignement une étude bibliographique en lien avec son projet de stage (thème défini en concertation avec le responsable du stage) ainsi qu'un échéancier des expériences à réaliser pour mener à bien son projet. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire que vous nous transmettiez vos propositions de stage **le plus tôt possible et avant le 1^{er} septembre 2017**.

A l'issue du stage, les étudiants auront à rédiger un rapport (d'une trentaine de pages) et à présenter oralement leur travail lors d'une soutenance, confidentielle ou non, prévue fin juin.

Merci par avance pour votre aide à la formation de nos étudiants et pour vos propositions de stages.

Cécile Bernard & Fabien Joux

Responsables du parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé » (UPMC-MNHN)

Les propositions de stage sont à renvoyer par e-mail aux adresses suivantes :

Fabien Joux : joux@obs-banyuls.fr

Cécile Bernard : cbernard@mnhn.fr

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : Irstea UR Riverly

Adresse : 5 Rue de La Doua, CS20244 69625 Villeurbanne Cedex

Responsable du Laboratoire / Entreprise : Gilles PINAY

Responsable de l'encadrement : Stéphane PESCE

Téléphone : 04 2 20 87 95

Fax :

E-mail : stephane.pesce@irstea.fr

Co-encadrant éventuel : Chloé BONNINEAU

Perspectives de poursuite de thèse :

oui

non

avec une bourse spécifique

oui (financement ANR)

non

2. Titre, description du sujet, approches utilisées, références (2 pages maximum) :

Titre :

Effets de deux antibiotiques de la famille des sulfonamides sur des communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires : impacts écotoxicologiques et adaptation

Description du sujet et des approches utilisées :

Après leur découverte au début du 20^{ème} siècle, la production et la consommation d'antibiotiques ont augmenté massivement dans le monde entier, permettant une réduction significative des décès causés par les maladies infectieuses. En 2015, environ 1300 tonnes d'antibiotiques ont été vendus en France dont 60 % destiné à la médecine humaine et 40 % à la santé animale [1]. Les antibiotiques sont des substances actives qui ne sont que partiellement métabolisées puis excrétées [2]. Ils se dispersent donc dans l'environnement aquatique du fait de rejets diffus (agricoles suite aux traitements vétérinaires ou épandages des déchets, assainissements individuels...) et de leur transport massif via les eaux usées collectées dans les stations de traitement des eaux usées [3].

Parmi les antibiotiques, les sulfonamides (SM) sont particulièrement répandus à travers le monde dans les différents compartiments environnementaux [4] en raison de leur utilisation fréquente, de leurs taux d'excrétion élevés, d'une stabilité physique importante et d'une persistance relative dans les sols [5]. Les SM sont des agents bactériostatiques à large spectre qui inhibent la biosynthèse de l'acide folique dans les cellules bactériennes. Dans les milieux aquatiques, ils constituent donc une menace pour les micro-organismes autochtones. Compte tenu du rôle écologique majeur joué par les communautés microbiennes, une contamination chronique peut donc induire un risque important pour le fonctionnement de ces écosystèmes. De plus, cela peut également conduire à la sélection de gènes de résistance aux antibiotiques (notamment gènes *suI*) dans les communautés microbiennes exposées [6] et contribuer à leur dispersion dans l'environnement. Une telle dispersion engendre un problème sanitaire majeur puisqu'à ce jour, à l'échelle du globe, environ 700 000 décès par an sont attribués à des infections par des bactéries résistantes aux antibiotiques et l'augmentation de ces antibiorésistances pourrait entraîner jusqu'à 10 millions de morts en 2050 [7].

A l'échelle des communautés microbiennes, le développement des espèces les plus résistantes au détriment des plus sensibles peut conduire à une augmentation globale de la tolérance de la communauté aux antibiotiques [5], qui s'accompagne généralement d'une baisse de la diversité, conformément au concept PICT (« Pollution Induced Community Tolerance » ; [8]). Outre le développement de capacités de résistance/tolérance, l'adaptation microbienne aux SM peut également se traduire par une stimulation des capacités des communautés naturelles à biodégrader ces antibiotiques. Une exposition répétée au SM sulfaméthazine (SMZ) peut ainsi permettre à la microflore du sol de développer la capacité à minéraliser cet antibiotique [9]. La souche *Microbacterium sp. C448*, résistante à SMZ et capable de minéraliser le SMZ a ainsi été isolé [9] et son génome complet a été obtenu [10]. D'autres isolats bactériens appartenant au genre *Microbacterium* capables de résister à d'autres sulfonamides (et notamment le sulfaméthoxazole, SMX) et de les minéraliser ont été également isolés de matrices environnementales régulièrement exposées à ces antibiotiques [e.g. 11].

Même si de nombreuses recherches font état d'une contamination fréquente des milieux aquatiques par les antibiotiques, leur distribution entre la phase dissoute et le compartiment sédimentaire reste difficile à établir et est influencée par les caractéristiques physico-chimiques du milieu, notamment des sédiments [12]. De même, les connaissances concernant la réponse des communautés microbiennes aquatiques à cette contamination restent très fragmentaires, tant en terme de réponse écotoxicologique que d'adaptation sous forme de tolérance/résistance ou de potentiel de biodégradation [13].

Dans ce contexte, le stage proposé visera à mieux appréhender la réponse des communautés microbiennes benthiques à une exposition réaliste à des antibiotiques de la famille des sulfonamides, en prenant comme modèles le sulfaméthazine (SMZ) et le sulfaméthoxazole (SMX). Les effets individuels de chacun de ces deux antibiotiques seront évalués sur des communautés naturelles issues d'une rivière non contaminée par ces substances (et donc théoriquement non adaptées). Le compartiment périphytique et le compartiment sédimentaire seront considérés afin de tenir compte des spécificités écologiques des communautés microbiennes qui s'y développent (dominées respectivement par des microorganismes phototrophes et hétérotrophes) et de la distribution des SM dans l'environnement aquatique.

Pour ce faire, une approche expérimental en canaux artificiels de laboratoire sera mise en œuvre. Les communautés seront exposées pendant un mois environ à chacun des composés en testant deux concentrations respectivement représentatives d'une contamination chronique (i.e. quelques centaines de ng/L) et d'une contamination aiguë (i.e. quelques µg/L). Les effets écotoxicologiques sur les communautés microbiennes phototrophes et hétérotrophes seront appréhendés à partir d'une combinaison de descripteurs structuraux (biomasse algale, structure des communautés diatomiques et bactériennes...) et fonctionnels (photosynthèse, activités enzymatiques, respiration, dénitrification...). Une attention particulière sera également portée à l'étude des capacités d'adaptation des communautés aux contaminants testés. Celle-ci sera mise en œuvre via i) la mesure des niveaux de tolérance dans le cadre d'une approche PICT, ii) la quantification de gènes impliqués dans la résistance aux SM (*sul I*, *sul II* et *sul III*) et iii) l'estimation du potentiel des communautés à dégrader SMZ et SMX à partir d'une approche de radiorespirométrie [14]. Les résultats de ces mesures de biodégradation potentielle seront mis en regard de l'évolution des concentrations en SMZ et en SMX mesurées dans les canaux artificiels et de l'apparition éventuelle de produits de dégradation au cours du suivi [13].

La réalisation du stage, qui s'inscrit dans le cadre d'un projet ANR en démarrage (projet ANTIBIOTOX, 2018-2022), fera donc appel à de nombreuses compétences afin :

- d'assurer la mise en œuvre et le suivi logistique d'un dispositif expérimental complexe (une trentaine de canaux artificiels),

- de réaliser les mesures d'activités microbiennes (activités enzymatiques et photosynthèse par fluorimétrie, activités métaboliques par chromatographie en phase gazeuse, biodégradation par radiorespirométrie) et d'en appliquer certaines dans le cadre des tests de toxicité dans les approches PICT,
- d'effectuer les analyses de biologie moléculaire pour caractériser la structure des communautés bactériennes (par PCR-ARISA) et quantifier les gènes de résistances (par qPCR),
- et de contribuer aux analyses chimiques visant à quantifier les antibiotiques et leurs métabolites.

L'étudiante participera à l'ensemble de ces analyses, en s'appuyant sur un fort soutien technique de la part de l'équipe d'accueil (Irstea UR Riverly, Villeurbanne) et des partenaires impliqués (Fabrice Martin-Laurent de l'UMR Agroécologie de Dijon et Pascale Besse-Hoggan de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand) qui accueilleront également ponctuellement l'étudiante dans le cadre de mobilités de courte durée (quelques jours à quelques semaines). En complément, Soizic Morin (Irstea, UR EABX, Bordeaux) assurera la réalisation des analyses taxonomiques des diatomées (sans implication de l'étudiante).

Références bibliographiques :

- [1] Maugat S, Berger-Carbonne A et al., 2016. Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. Saint-Maurice: Santé publique France ; 20 p.
- [2] Voulvoulis N, Barceló D, Verlicchi P, 2016. Pharmaceutical residues in sewage treatment works and their fate in the receiving environment. *Issues Environ. Sci. Technol.* 2016–January, 120–179.
- [3] Osorio V, Larrañaga A, Aceña J, Pérez S, Barceló D, 2016. Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Sci. Total Environ.* 540, 267–277.
- [4] Baran W, Sochacka J, Wardas W A A, 2006. Toxicity and biodegradability of sulfonamides and products of their photocatalytic degradation in aqueous solutions. *Chemosphere*, 65, 1295-1299.
- [5] Brandt K K, Sjøholm OR, Krogh KA, Halling-Sørensen B, Nybroe O, 2009. Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2963-2968.
- [6] Kozak G K, Pearl D L, Parkman J, Reid-Smith R J, Deckert A, Boerlin P, 2009. Distribution of sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from swine and chickens at abattoirs in Ontario and Québec, Canada. *Env. Microbiol.* 75: 5999-6001.
- [7] O'Neill J et al., 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Rev. Antimicrob. Resist.* (https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- [8] Blanck, H., Wängberg, S.A., Molander, S., 1988. Pollution-induced community tolerance—a new ecotoxicological tool. In: Cairns, J., Pratt, J.R. (Eds.), *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*. ASTM STP 988, Philadelphia, pp. 219–230.
- [9] Topp E, Chapman R, Devers-Lamrani M, Hartmann A, Marti R, Martin-Laurent F, Sabourin L, Scott A, Sumarah M, 2013. Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a sulfamethazine degrading sp. *J. Environ. Qual.* 42, 173–178.
- [10] Martin-Laurent F, Marti R, Waglechner N, Wright GD, Topp E, 2014. Draft genome sequence of the sulfonamide antibiotic-degrading *Microbacterium* sp. Strain C448. *Genome Announc.* 2, e01113-13.
- [11] Bouju H, Ricken B, Beffa T, Corvini PF-X, Kolvenbach BA, 2012. Isolation of Bacterial Strains Capable of Sulfamethoxazole Mineralization from an Acclimated Membrane Bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 277–279.
- [12] Zhang G, Liu X, Sun K, Zhao Y, Lin C, 2010. Sorption of tetracycline to sediments and soils: Assessing the roles of pH, the presence of cadmium and properties of sediments and soils. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 4, 421–429.
- [13] Vila-Costa M, Gioia R, Aceña J, Pérez S, Casamayor EO, Dachs J, 2017. Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism. *Water Res.* 115, 309-317.
- [14] Pesce S, Martin-Laurent F, Rouard N, Montuelle B, 2009. Potential for microbial diuron mineralisation in a small wine-growing watershed: From treated plots to lotic receiver hydrosystem. *Pest Manag. Sci.* 65, 651–657.