

Résumé de thèse de doctorat

Titre : *Réponses microbiennes au tétrachlorure de carbone*

Présentée par : *PENNY Christian*
Boursier du Fonds National de la Recherche du Luxembourg

Discipline : *Sciences du Vivant*

Spécialité : *Physiologie et Biologie des Organismes - Populations - Interactions*

Unité de recherche : *UMR 7156 Université de Strasbourg / CNRS*
Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie

Directeurs de thèse : *VUILLEUMIER Stéphane (Professeur UDS) et*
BRINGEL Françoise (Chercheure CNRS, HDR)

Mots-clés : *Microbiologie environnementale, biodiversité, bioremédiation,*
déchloration microbienne, polluants chlorés

ECOLE DOCTORALE :

<input type="checkbox"/> ED - Sciences de l'Homme et des sociétés	<input type="checkbox"/> ED 269 - Mathématiques, sciences de l'information et de l'ingénieur
<input type="checkbox"/> ED 99 – Humanités	<input type="checkbox"/> ED 270 – Théologie et sciences religieuses
<input type="checkbox"/> ED 101 – Droit, sciences politique et histoire	<input type="checkbox"/> ED 413 – Sciences de la terre, de l'univers et de l'environnement
<input type="checkbox"/> ED 182 – Physique et chimie physique	<input checked="" type="checkbox"/> ED 414 – Sciences de la vie et de la santé
<input type="checkbox"/> ED 221 – Augustin Cournot	
<input type="checkbox"/> ED 222 - Sciences chimiques	

Les solvants halogénés sont des polluants majeurs du sol et des nappes d'eau souterraines. Ils sont détectés dans 14% des sites répertoriés en France par le ministère de l'écologie et du développement durable (<http://basol.ecologie.gouv.fr>). Parmi ces polluants, le tétrachlorure de carbone (CCl₄) est d'origine essentiellement anthropique. C'est une substance halogénée volatile dont la contribution à la destruction de la couche d'ozone stratosphérique serait d'environ 9 % en équivalents d'atomes de chlore (Butler, 2000). Avant que sa toxicité pour la santé humaine ne soit avérée, ce halométhane a été massivement employé en tant qu'agent de dégraissage industriel, comme retardateur de feu, dans les systèmes de réfrigération ou encore comme pesticide (Doherty, 2000). Dans l'environnement, le CCl₄ est récalcitrant à une dégradation abiotique. Des microorganismes de divers phyla eubactériens et des *Archaea* sont capables de catalyser sa déchloration en absence d'oxygène par co-métabolisme (cf. « Carbon Tetrachloride Pathway Map (Anaerobic) » ; http://umbbd.msi.umn.edu/ctc/ctc_map.html). Ainsi, en conditions réductives, de petites molécules excrétées par des microorganismes catalysent la dégradation du CCl₄ à l'extérieur de la cellule (Field et Sierra-Alvarez, 2004), sans qu'il ne soit utilisé comme source de carbone ou d'énergie. Le CCl₄ peut aussi intervenir comme accepteur terminal d'électrons lors de la déhalorespiration par certains microorganismes. La bio-réhabilitation de sites contaminés par des microorganismes capables de dégrader le polluant, constitue une approche de décontamination émergente (Pandey et coll., 2009). Ces stratégies requièrent néanmoins une connaissance de la structure et des capacités métaboliques des populations microbiennes *in situ*, dans l'optique de stimuler l'activité de dégradation du polluant tout en veillant à l'équilibre de l'écosystème.

Ma thèse avait pour objectif de mieux comprendre le rôle des microorganismes dans la dégradation biotique du CCl₄. Mon travail s'est articulé en deux volets principaux, à savoir l'analyse de mécanismes microbiens d'adaptation à la toxicité du CCl₄ et la caractérisation de nouveaux consortia microbiens déchlorants, isolés à partir de la microflore d'une nappe phréatique contaminée par le CCl₄ et potentiellement actifs dans l'atténuation naturelle de ce solvant.

Ecologie microbienne d'un écosystème contaminé par le CCl₄

L'impact du CCl₄ sur la dynamique et le fonctionnement de la flore microbienne d'un écosystème pollué a été étudié dans le cadre d'un aquifère contaminé en 1970 par le déversement accidentel de 6 tonnes de ce solvant organique. L'infiltration du CCl₄ dans la nappe phréatique, demeurée non détectée pendant 20 ans, a entraîné la formation d'un panache de pollution de plus de 10 km. Les concentrations maximales de CCl₄ mesurées à la zone source de la pollution excédaient plus de 1000 fois le taux limite établi par l'OMS pour les eaux potables (4 µg L⁻¹). Une réhabilitation du site par des méthodes physico-chimiques a été initiée en 2006. Cette zone source en contact avec le polluant depuis plus de 38 ans représente une opportunité pour étudier les communautés microbiennes du site et en caractériser les populations capables de dégrader le CCl₄.

Une première étape a été d'inventorier la diversité structurale des communautés microbiennes sur le site au cours de la dépollution. Trois campagnes de prélèvements d'échantillons d'eau de nappe phréatique, échelonnées sur 15 mois, ont été réalisées afin de dresser les profils de la structure des populations cultivables et non cultivables. L'approche moléculaire a permis de s'affranchir des limitations d'étapes de culture qui ne reflètent généralement qu'un faible pourcentage de la diversité microbienne totale. Des empreintes génétiques ont été établies par « Terminal restriction fragment length polymorphism » (T-RFLP), en ciblant les gènes de l'ARNr 16S comme marqueur génétique universel des procaryotes. Au total, 236 sous-populations eubactériennes avec des proportions relatives comprises entre 0,01 et 11 % de la communauté totale, ont été répertoriées et leur distribution suivie au cours du temps. Parmi ces sous-populations, 110 sont communes aux trois campagnes de prélèvement et représentent plus de 80% de la diversité de la communauté. Ces résultats montrent une stabilité globale de la structure de la communauté eubactérienne au cours du temps. Des expériences de T-RFLP et d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) spécifiques des *Archaea* ont en outre permis la détection de 91 populations archéennes dont la

proportion totale au sein de la microflore de l'eau de nappe à la source de la contamination a pu être estimée à 0,2 – 0,5 %.

La dégradation du CCl_4 par des microorganismes isolés du site a ensuite été étudiée en réalisant des cultures d'enrichissement dans des conditions sélectives et en variant plusieurs paramètres comme la teneur en oxygène, la concentration de CCl_4 , la source de carbone et d'énergie ou encore les accepteurs d'électrons potentiels. Sur les 130 cultures réalisées dans 30 conditions différentes, seules 6 d'entre elles, toutes en conditions fermentatives / méthanogènes, catalysent une réduction significative du CCl_4 . L'efficacité de dégradation du CCl_4 varie entre 50 et 100 % pour des vitesses de 1,4 à 3,2 $\mu\text{g jour}^{-1} \text{mg}(\text{protéine})^{-1}$. Ces cultures d'enrichissement présentent des profils T-RFLP différents et sont composées de plusieurs souches microbiennes, dont la proportion dans l'échantillon d'eau de nappe d'origine est estimée à 0,1 - 2 %. L'identification des taxons d'intérêt a été établie sur la base des séquences du gène de l'ARNr 16S obtenues par amplification PCR, suivie d'une étape de séparation séquence-dépendante des fragments d'ADN par « denaturing high performance liquid chromatography » (D-HPLC) ou d'un clonage avant séquençage.

L'analyse du mécanisme de dégradation du CCl_4 a été entreprise pour un consortium stable, composé majoritairement de bactéries de la famille des *Clostridiaceae* et capable d'une dégradation totale du CCl_4 (10 mg L^{-1}) en 6 jours (2,6 $\mu\text{g jour}^{-1} \text{mg}[\text{protéine}]^{-1}$). Ce consortium anaérobie strict, mais aérotolérant, est capable de se développer dans des conditions proches d'une eau de nappe phréatique. Une molécule thermostable excrétée dans le milieu environnant est impliquée dans la dégradation réductive du CCl_4 . Des expériences d'identification de cette molécule sont en cours. En collaboration avec le bureau d'étude en charge de la dépollution du site, ce consortium pourra maintenant être introduit *in situ* afin d'évaluer sa stabilité dans le contexte de la nappe phréatique contaminée.

Les résultats de cette partie de la thèse sont actuellement en cours de rédaction, sous la forme de deux articles, l'un décrivant l'optimisation de la technique de T-RFLP couplée à la D-HPLC pour l'étude phylogénétique de communautés microbiennes, l'autre décrivant les aspects d'écologie microbienne du site d'étude.

Adaptation membranaire des bactéries aux méthanes chlorés : le dichlorométhane et le CCl_4 induisent une modification de la composition en acides gras phospholipidiques

Outre la dégradation des solvants organiques en produits non toxiques, les bactéries mettent en jeu d'autres mécanismes de résistance comme par exemple l'excrétion de ces composés hors de la cellule ou un changement de la composition membranaire. Ainsi, des bactéries à Gram-négatif, lorsqu'elles sont exposées à des composés lipophiles, augmentent la proportion des acides gras saturés dans les phospholipides (Segura et coll., 1999). Ce phénomène est bien documenté pour les solvants aromatiques tel que le toluène ($\log[\text{P}_{\text{OW}}] = 2,69$)¹. Ce chapitre décrit pour la première fois l'adaptation membranaire d'une bactérie exposée à des solvants monocarbonés, le dichlorométhane (DCM, CH_2Cl_2 , $\log[\text{P}_{\text{OW}}] = 1,25$) et le CCl_4 ($\log[\text{P}_{\text{OW}}] = 2,83$). L'organisme de référence choisi pour cette étude est *Methylobacterium extorquens* DM4, une alpha-protéobactérie méthylo-trophe, étudiée au laboratoire et capable d'utiliser le DCM, le solvant halogéné industriel quantitativement le plus important et un produit de dégradation possible du CCl_4 , comme unique source de carbone et d'énergie. Le génome de la souche, d'une taille de 6 Mb (environ 6000 gènes), a été séquencé et récemment publié (Vuilleumier et coll., 2009). Ma contribution dans l'exploration fonctionnelle du génome de la souche DM4 a été de décrire les gènes impliqués dans le métabolisme membranaire et de dresser les voies de biosynthèse et de modification des acides gras. L'analyse *in silico* indique les potentialités de cette souche à faire face à l'exposition aux solvants lipophiles notamment 4

¹ Le caractère lipophile et fluidifiant des solvants organiques peut être exprimé par le logarithme du coefficient de partition d'un composé dans un mélange eau/octanol ($\log[\text{P}_{\text{OW}}]$). Des substances ayant un $\log(\text{P}_{\text{OW}})$ compris entre 1,5 et 3 sont en général très toxiques pour les cellules vivantes (Ramos et coll., 1997).

isomérasas et 2 désaturases putatives qui pourraient jouer un rôle dans les modifications de la composition phospholipidique.

La toxicité du CCl₄ pour la souche DM4 est nettement plus prononcée que celle du DCM : les concentrations minimales inhibitrices de ces deux halométhanes sont de 2 mM pour le CCl₄ et de 20 mM pour le DCM dans les conditions testées. L'effet du CCl₄ sur la composition en acides gras est aussi plus prononcé que celui du DCM à des concentrations équivalentes. La réponse de la souche est similaire à celle généralement observée pour les autres solvants organiques, avec une augmentation du degré de saturation des acides gras. Lorsque la souche DM4 est cultivée avec le méthanol, un composé en C1 à pouvoir solvant faible ($\log[P_{OW}] = -0,82$), comme source de carbone et d'énergie, et en présence de CCl₄, un effet synergique entre les deux solvants est observé quant à la proportion d'acides gras saturés. Une corrélation nette entre le degré de saturation et le temps de génération de la souche DM4 a pu être établie. La réponse aux effets toxiques du CCl₄ et du DCM comprend donc des adaptations physiologiques potentiellement coûteuses en énergie pour assurer l'homéostasie de la fluidité membranaire et le maintien des fonctions métaboliques de la souche.

Cette étude, menée en collaboration avec une équipe de recherche à Leipzig en Allemagne spécialisée dans l'analyse des adaptations membranaires des microorganismes, fera également l'objet d'un article.

Conclusions & Perspectives

Ce travail de thèse a contribué à la mise en place et au développement dans l'équipe d'accueil d'outils expérimentaux pour des études du compartiment microbien de biocénoses naturelles, polluées ou perturbées : échantillonnage sur site, extraction d'ADN environnemental, T-RFLP, D-HPLC, cultures en conditions anoxiques, chromatographie en phase gazeuse notamment.

Ces approches ont permis l'isolement de 6 consortia bactériens, enrichis de l'eau de nappe contaminée et capables de dégrader le CCl₄ en conditions de laboratoire. Une première perspective de mon travail consisterait à caractériser les voies biochimiques recrutées pour la déchloration et à suivre le devenir de l'atome de carbone du CCl₄. Ceci permettrait de déterminer si le ou les microorganismes responsables de cette dégradation peuvent en tirer profit en termes d'énergie ou si l'activité de dégradation du CCl₄ est un métabolisme fortuit d'oxydoréduction, médié par des cofacteurs catalytiques extracellulaires. Une exploration fonctionnelle plus approfondie des souches, gènes et enzymes impliqués dans les processus de déchloration du CCl₄ pourrait être réalisée par la construction d'une banque métagénomique représentative du répertoire génétique des communautés microbiennes de l'aquifère. Dans un deuxième temps, l'activité de dégradation du CCl₄ *in situ* de ces microorganismes et leur contribution à l'atténuation de ce composé dans l'eau de nappe polluée pourrait être déterminée. A plus long terme, les connaissances acquises sur la biodégradation du CCl₄ vont servir dans des applications de bio-réhabilitation de sites contaminés par des composés organohalogénés. Ceci comprend le suivi des communautés endogènes impliquées dans le processus de déchloration (atténuation naturelle) et/ou l'utilisation de microorganismes particulièrement efficaces pour des traitements *in situ* ou *ex situ* (biostimulation et bioaugmentation).

Références

- Butler, J.H. (2000). Better budgets for methyl halides? *Nature* **403**, 260-261.
- Doherty, R.E. (2000). A history of the production and use of carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane in the United States: part 1 – historical background; carbon tetrachloride and tetrachloroethylene. *Environ. Forensics* **1**, 69-81.
- Field, J.A. et Sierra-Alvarez, R. (2004). Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic compounds. *Rev. Environ. Sci. & Bio/Technol.* **3**, 185-254.

Pandey, J., Chauhan, A. et Jain, R.K. (2009). Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of *in situ* bioremediation. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 324-375.

Ramos, J.L., Duque, E., Rodriguez-Herva, J-J., Godoy, P., Haïdour, A., Reyes, F. et Fernandez-Barrero, A. (1997). Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**, 3887-3890.

Segura, A., Duque E., Mosqueda, G., Ramos, J.L. et Junker, F. (1999). Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ. Microbiol.* **1**, 191-198.

Communications scientifiques

Publications

Vuilleumier, S., Chistoserdova, L., Lee, M., Bringel, F., Lajus, A., Zhou, Y., Gourion, B., Barbe, V., Chang, J., Cruveiller, S., Dossat, C., Gillett, W., Gruffaz, C., Haugen, E., Hourcade, E., Levy, R., Mangenot, S., Muller, E., Nadalig, T., Pagni, M., **Penny, C.**, Peyraud, R., Robinson, D.G., Roche, D., Rouy, Z., Saenampechek, C., Salvignol, G., Vallenet, D., Wu, Z., Marx, C.J., Vorholt, J.A., Olson, M.V., Kaul, R., Weissenbach, J., Médigue, C. et Lidstrom, M.E. (2009). *Methylobacterium* genome sequences: a reference blueprint to investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. *PLoS ONE* **4**, e5584.

Présentations orales

Penny, C., Nadalig, T., Vuilleumier, S. & Bringel, F. Identification of CCl₄-degrading microorganisms in contaminated groundwater combining molecular and cultural strategies. *4th European Bioremediation Conference*. Chania (Crête, Grèce), 3-6 septembre 2008.

Penny, C. Réponses microbiennes au tétrachlorure de carbone (CCl₄). *Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann*. Belvaux (Luxembourg), 12 mars 2008.

Bringel, F., Hourcade, E., Lang, R., Penny, C., Roselli, S., Nadalig, T., Geoffroy, V. & Vuilleumier, S. Functional genomics of methylotrophic proteobacteria growing with chlorinated C1 pollutants. *Conférence Jacques-Monod, Génomique environnementale : des génomes individuels aux génomes de communautés complexes d'organismes*. Roscoff (France), 9-13 juin 2007.

Penny, C., Nadalig, T., Bringel, F. & Vuilleumier, S. Dégradation microbienne du tétrachlorure de carbone en milieu contaminé : Quel rôle pour les métaux ? *Symposium métaux et microorganismes : chimie, biologie et applications*. Illkirch-Graffenstaden (France), 7 décembre 2006.

Présentations poster

Penny, C., Nadalig, T., Bringel, F. & Vuilleumier, S. Microbial diversity of a carbon tetrachloride-polluted aquifer. *14th International Biodeterioration & Biodegradation Symposium*. Riviera di Taormina Capo Sant'Alessio (Messina, Italie), 6-11 octobre 2008. (Bourse pour jeunes chercheurs de la FEMS)

Penny, C., Nadalig, T., Alioua, M., Bringel, F. & Vuilleumier, S. Identification of CCl₄-degrading microorganisms in contaminated groundwater combining molecular and cultural strategies. *Molecular basis of microbial one carbon metabolism, Gordon Conference*. Lewiston (Maine, Etats-Unis), 20-25 juillet 2008.

Penny, C., Nadalig, T., Bringel, F. & Vuilleumier, S. Microbial diversity of a carbon tetrachloride-polluted site. *2^{ièmes} Rencontres de Chimie et Biologie Moléculaires*. Strasbourg (France), 23 juin 2008.

Bringel, F., Hourcade, E., Lang, R., Penny, C., Roselli, S., Nadalig, T., Geoffroy, V. & Vuilleumier, S. Functional genomics of methylotrophic proteobacteria growing with chlorinated C1 pollutants. *Conférence Jacques-Monod : Génomique environnementale*. Roscoff (France), 9-13 juin 2007.

Vuilleumier S., Chistoserdova, L., Lajus, A., Rouy, Z., Bringel, F., Gourion, B., Barbe, V., Nadalig, T., Hourcade, E., Lang, R., Roselli, S., Penny, C., Geoffroy, V., Zhou, Y., Dossat, C., Mangenot, S., Vallenet, D., Vorholt, J., Médique, C. & Lidstrom, M.E. Exploration génomique du métabolisme en C1 aux polluants halogénés dichlorométhane et chlorométhane chez *Methylobacterium*. *Colloque annuel de la Société Française de Microbiologie*. Nantes (France), 29-31 mai 2007.

Penny, C., Nadalig, T., Schaeffer, P., Albrecht, P., Bringel, F. & Vuilleumier, S. Microbial response to carbon tetrachloride (CCl₄). *International Conference on Environmental Biotechnology, ISEB ESEB JSEB*. Leipzig (Germany), 9-13 juillet 2006.

Nadalig, T., Penny, C., Bringel, F., Meyer, J. M. & Vuilleumier, S. Déchloration microbienne du tétrachlorure de carbone (CCl₄). 2^{ième} *Colloque d'écologie microbienne*. Obernai (France), 9-12 mai 2005.