



HAL
open science

Impact des communautés microbiennes sur la dynamique de dégradation de micropolluants organiques au sein d'écosystèmes épuratoires et sur l'expression de leur toxicité

Florence Braun

► **To cite this version:**

Florence Braun. Impact des communautés microbiennes sur la dynamique de dégradation de micropolluants organiques au sein d'écosystèmes épuratoires et sur l'expression de leur toxicité. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2012. Français. NNT: . tel-02811113

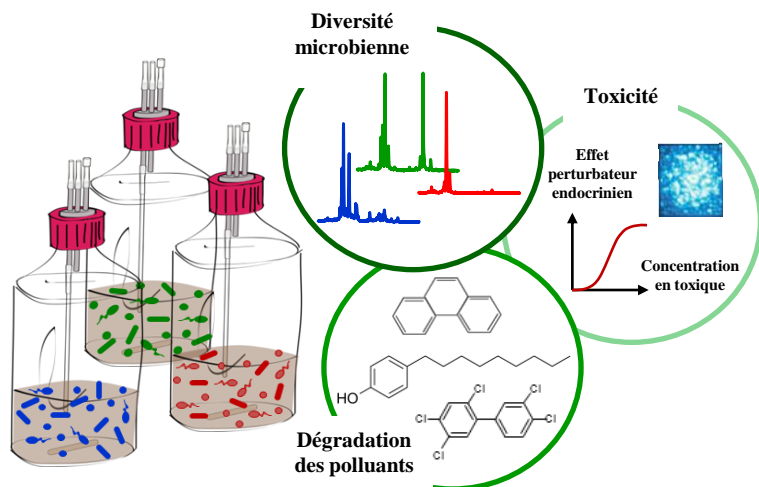
HAL Id: tel-02811113

<https://hal.inrae.fr/tel-02811113>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Impact des communautés microbiennes sur la dynamique de dégradation de micropolluants organiques au sein d'écosystèmes épuratoires et sur l'expression de leur toxicité

Impact of microbial communities on the dynamic of organic micropollutants degradation in wastewater ecosystems and on the expression of their toxicity

Florence BRAUN

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

***Discipline : Biotechnologie - Microbiologie
Ecole Doctorale : Sciences des Procédés - Sciences des Aliments***

présentée et soutenue publiquement

par

Florence BRAUN

le Jeudi 20 Décembre 2012

Titre :

**Impact des communautés microbiennes
sur la dynamique de dégradation de micropolluants organiques
au sein d'écosystèmes épuratoires
et sur l'expression de leur toxicité**

Jury

M. Robert DURAN Professeur, Université de Pau et pays de l'Adour	, Rapporteur
M. Stéphane VUILLEUMIER Professeur, Université de Strasbourg	, Rapporteur
M^{me} Christelle WISNIEWSKI Professeur, Université Montpellier I	, Examinatrice
M^{me} Jennifer HARRIS-HELLAL Docteur, BRGM Orléans	, Examinatrice
M. Jérôme HAMELIN Chargé de Recherche, INRA LBE Narbonne	, Co-directeur de Thèse
M^{me} Dominique PATUREAU Directrice de Recherche, INRA LBE Narbonne	, Directrice de Thèse

RESUME : Les activités anthropiques génèrent une contamination à de faibles doses des boues de station d'épuration par des micropolluants organiques persistants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles et le nonylphénol. Cette étude porte sur la détermination de l'influence des microorganismes au cours de la méthanisation sur le devenir de ces trois familles de micropolluants. Un protocole spécifique a été mis au point pour extraire des microorganismes de leur écosystème d'origine tout en conservant la singularité structurelle et fonctionnelle des communautés. Trois communautés, aux passifs de pollution différents, ont ainsi été soumises à la même pression de sélection (substrat et disponibilité en micropolluant) dans des bioréacteurs continus de méthanisation. Ces trois écosystèmes se sont alors distingués parfaitement via les caractéristiques de leurs communautés et la réalisation de fonctions diverses de digestion. Or, la dégradation des micropolluants a convergé dans ces 3 systèmes, démontrant l'absence de lien direct entre méthanogenèse et dégradation de ces molécules et une absence de spécialisation des communautés pour cette dégradation. En outre, il a été observé que la répartition des micropolluants au sein de la boue est influencée par les voies métaboliques des communautés. Plus le degré de digestion est avancé, plus les micropolluants sont abondants dans le compartiment aqueux et sorbés à la matière dissoute et colloïdale. Des fonctions, spécifiques de la dégradation des micropolluants, ont été étudiées (i) en suivant l'assimilation de phénanthrène marqué au ¹³C en culture batch, source principale de carbone, ce qui n'a pas permis d'observer sa minéralisation et (ii) en recherchant la présence de gènes fonctionnels ce qui n'a pas permis la détection des fonctions ciblées. Parmi les activités œstrogéniques, androgéniques, *dioxin-like* et *HAP-like* mesurées à l'état d'équilibre, l'activité *HAP-like* est la plus exprimée dans les réacteurs. Le degré de digestion, via une modification de la répartition des HAP, explique l'augmentation de l'activité *HAP-like* dans le compartiment aqueux des boues les plus digérées (et sa diminution dans le compartiment particulaire). L'activité *HAP-like* n'est pas entièrement expliquée par le dosage des HAP, ce qui suggère la présence d'intermédiaires métaboliques ayant une activité biologique et dont la nature différerait suivant le métabolisme exprimé par les communautés microbiennes.

TITLE : Impact of microbial communities on the dynamic of organic micropollutants degradation in wastewater ecosystems and on the expression of their toxicity

ABSTRACT : Due to anthropogenic activity the sludge of wastewater treatment plants are contaminated by organic micropollutants like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), polychlorinated biphenyls and nonylphenol. This study focuses on the influence of microbial communities on the fate of these three micropollutants families during the anaerobic digestion process. A specific protocol was developed to extract microorganisms from their native ecosystem while maintaining their structural and functional singularity. Three communities, with different pollution history, were thus extracted and subjected to the same selection pressure (availability of substrate and micropollutants) in continuous anaerobic digesters. These three ecosystems can be perfectly identified through the characteristics of their microbial communities and their global metabolism. However, our results show also that the degradation of micropollutants converged in these 3 systems, demonstrating the absence of link between methanogenesis and micropollutants degradation and of specialization of the microbial communities toward this degradation. In addition, the distribution of micropollutants in sludge is influenced by the metabolic pathways of those communities. The more the digestion is advanced, the greater the micropollutants are abundant in the aqueous compartment and adsorbed to the dissolved and colloidal matter. Specific functions for micropollutants degradation were studied (i) by following ¹³C-labeled phenanthrene assimilation as main carbon source, which did not allow observing its mineralization and (ii) by exploring the presence of functional genes, which did not allow the detection of the targeted functions. Among the estrogenic, androgenic, dioxin-like and PAH-like activities, PAH-like activity is more expressed in all reactors at the steady state. The different degrees of digestion, through a change in PAH distribution, explain the increase in PAH-like activity in the aqueous compartment of the most digested sludge (and its decrease in the particulate compartment). PAH-like activity is not fully explained by PAH quantification, suggesting the presence of by-products with biological activity and which could be different depending on the metabolic pathway of the microbial communities.

DISCIPLINE : Biotechnologie – Microbiologie

MOTS-CLES : Biodégradation, communautés microbiennes, hydrocarbures aromatiques polycycliques, méthanisation, micropolluants organiques, nonylphénol, polychlorobiphényles, toxicité

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : Institut National de Recherche Agronomique – Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (INRA-LBE), UR050, Avenue des Etangs, F-11100 NARBONNE

REMERCIEMENTS

Ces années de thèse n'ont pas seulement été une belle aventure scientifique ou professionnelle, elles ont été jalonnées de belles rencontres, de moments de joie et d'épreuves et ont permis de tisser des liens sincères.

Aussi en premier lieu, je voudrais remercier chaleureusement pour ces 4 années mon duo d'encadrants de choc **Dominique Patureau** et **Jérôme Hamelin**. Merci pour votre confiance, vos encouragements, merci de m'avoir soutenue dans les moments difficiles et de vous être battus pour que je puisse finir ma thèse dans les meilleures conditions possibles. Cette aventure fut belle et vous avez plus que contribué à sa réussite ! Merci Jérôme de m'avoir guidée dans le microcosme des écologues microbiens, et merci pour nos discussions sur l'impro, les clowns, la vie !. Merci Domi, pour tous nos échanges si précieux, ton enthousiasme bouillonnant sans faille et tous les positrons que j'ai reçus et qui m'ont donné la force d'avancer !

Merci à notre directeur d'unité, **Jean-Philippe Steyer**, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de biotechnologie de Narbonne et d'avoir veillé au bon déroulement de mes travaux.

Au cœur du LBE, je tiens à remercier particulièrement **Nadine Delgenès**. Merci Nadine pour ta bienveillance et tous les conseils prodigués bien au-delà du cadre scientifiques ! Merci à mes bonnes fées de microbio **Gaëlle Gévaudan** et **Anaïs Bonnafous**. Merci à **Maialen Barret** de m'avoir guidée dans mes débuts de thésarde et, le hasard faisant bien les choses, de m'avoir soutenue et éclairée en fin de parcours.

Je tiens à remercier aussi les membres de mon jury de thèse, **Pr Robert Duran** de l'université de Pau et Pays de l'Adour, **Pr Stéphane Vuilleumier** de l'université de Strasbourg, **Pr Christelle Wisniewski** de l'Université Montpellier I, et **Jennifer Harris-Hellal** du BRGM d'Orléans, pour leur investissement dans l'évaluation de ce travail.

Je remercie évidemment l'ensemble des partenaires du projet PECMICMOG. Merci à **Hélène Budzinski**, **Edith Parlanti** et **Karyn Le Menach** pour votre implication. Merci à **Selim Ait-Aissa** et **Nicolas Creusot** de m'avoir aidée dans ma découverte de l'écotoxicologie. Merci à **Théodore Bouchez** et **Laurent Mazéas** pour m'avoir éclairée sur le fractionnement isotopique et ses débouchés, enfin un grand merci à **Carolina Hoyos-Hernandez** d'avoir si gentiment et patiemment veillé sur mes petites fioles.

J'adresse aussi toute ma gratitude aux membres de mon comité de thèse **Sabine Houot**, **Aurélie Cebron** et l'ingénieur ADEME chargé du suivi de mes travaux, **Guillaume Bastide**.

Merci à **Xin Mei** et **Mélanie**, pour notre bureau à la déco « chambre d'ado » mais dans lequel on se sent si bien ! Y a un « tuc » fort qui s'est tissé entre nous, bien au-delà de simples relations de bureau ! Merci à mes compagnons de galère qui comme moi sont tous devenus docteurs : **Amel**, ma mamie Gendouz dont le sourire suffisait à me rendre le moral ; **Yanou** pour cette nuit blanche de montage de film et les tous les fous rires

Remerciements

partagés ; **Mathieu L** que je ne peux remercier sans sa **Sophinette** pour tous les bons moments d'amitiés partagés ; **Alexis**, un coureur fou que je ne remercierais pas non plus sans **Alice** ; **Maialen**, ma compatriote de body combat et une amie sincère ; sans oublier bien sûr, **Charlie** et sa zen attitude, **Florian** et sa bonne humeur, **Glenda** et **Liliana** mes comparses sur les micropolluants, **Maxime** le révolutionnaire, **Sarah** la philosophe en herbe, **Juan** et ses percu, **Olivier** le breton et **Adeline** l'aveyronnaise... Et bon courage à ceux qui le seront bientôt : **Marie-Laure**, **Mel**, **Caro**, **Violette**, **Elsa**, **Elizabeth**, **J-C**, **Thibault**, et évidemment **Bruno**! Merci à **Emilie** la belle biterroise aux yeux bleus, à **Guillaume K** président du club ragot, à **Monique**, **Marianne**, **Gwen** et **Amandine** pour leur écoute, à **Micol** pour les moments passés à Copenhague, à **Virginie** pour son dynamisme, à **Fred** pour le soutien à grand renfort de chocolat (et **Corinne** pour les pralinoises), à **Bruno S** pour ces belles photos (et son arduino), à **Bruno M** pour ses visites quand je nourrissais mes bébés sous la hotte microbio. Merci à **Laurent**, **Renaud**, **Eric T**, **Claire**, **Hélène**, **Nico**, **Eric L**, **Thierry**, **Nathalie**, **Valérie**, **Guillaume G**, **Marjolaine**, **Kim**, **Jean-Philippe D**, à la « dream team » : **Nadine LT**, **Annie**, **Alexandra**, **Sylvie**, **Véro**, bref la liste est longue alors merci à tout cet écosystème LBE, peuplé de personnes (scientifiques, techniciens, précaires...) que je ne suis pas prête d'oublier !

Merci à **La tribu Braun**, trop grande pour en faire ici la liste, vous avez été ma force (car l'union fait la force dit-on) et merci aussi à la **tribu Bouquet**! Merci **Pouni**, merci **Mutti**, vous pouvez être fiers : vos filles sont docteurs ! Merci **Bi**, merci **Gi**, elle en a fait du chemin la ptit dernière et c'est beaucoup grâce à vous !

Merci au soutien et à l'amitié des bon'arts : **Les Tchoups**, **Marie-Laure**, **Math**, et **Mat & So** pour tous les délires, les jeux, les voyages, les répètes dans le grenier, les concerts, les soirées... Merci aux **Improvisibles** de m'avoir permis de me vider la tête dans une patinoire ! Merci à **Manou**, **Ptite Claire**, **Grande Claire**, **Mel** et **Cilou** pour nos weekends filles ! Merci à **Marie QST** et **Audrey**, mes chères drôles de dames avec lesquelles j'ai commencé en microbio ! Merci aux **potos d'école** éparpillés de par le monde (ENSAT T04 forever), à **Julie** pour tes tisanes et **Bastien** pour ta tarte au citron (comme une bouffée d'enfance), à Solène (courage, toi aussi tu vas y arriver !), à la bande des 5/2 (**Marianne**, **Amélie** et **Vincent**), à **Mathilde** pour les déjeuné au soleil et les décibels dans ton appart, à **Mymy** pour tes massages, à tous ceux qui de près ou de loin ont partagé notre aventure !

Et oui « notre » aventure, car ma thèse je la dois aussi à **Valentin** ! Les mots me manquent pour te remercier, Val... Merci d'avoir cru en moi, d'avoir été mon plus fervent supporter et de m'avoir entouré de tout ton amour...

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

Unités :

μg : microgramme
μL : microlitre
μM : micromolaire
Å : ångström
g : gramme
h : heure
j : jour
kg : kilogramme
kV : kilovolt
L : litre

M : molaire
m : mètre
mA : milliampère
mbar : millibar
mg : milligramme
min : minute
mL : millilitre
mM : milliMolaire
mm : millimètre
mV : millivolt

ng : nanogramme
nm : nanomètre
nM : nanomolaire
U : unité
rpm : rotation par minute
s : seconde

Abréviations :

§ : paragraphe
¹²C : carbone 12
¹³C : carbone 13
17β-E2 : 17 bêta œstradiol
7-ERF : éthoxyrésosofurine

ACN : acétonitrile

ACP (PCA): analyse en composante principale

ADN (DNA): acide désoxyribonucléique

ADNr : ADN ribosomique

AGV (VFA) : acide gras volatil

AhR : Récepteur des hydrocarbures aryliques (activité *HAP-like* et *dioxin-like*)

Alim : Boue servant d'alimentation

ANOSIM: analyse de similarité

ANOVA: analyse de variance

Ant : anthracène

AOX : halogène organique adsorbable

AR : récepteur des androgènes

Arch : *Archaea*

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

BaA : benzo(a)anthracène

Bact: *Bacteria*

BaP : benzo(a)pyrène

BbF : benzo(b)fluoranthène

BET : bromure d'éthidium

BghiP: benzo(g,h,i)perylène

BkF: benzo(k)fluoranthène

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

Abréviations et symboles

BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylène

C₂: acétate

C₃: propionate

C₄: butyrate

C₅: valérate

Caqu : concentration en micropolluant dans le compartiment aqueux

CAR : récepteur constitutif des androstanes

C_{DCM} : concentration en micropolluants dans la fraction dissoute et colloïdale

CEE-NU : Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe

CE-SSCP (ou SSCP) : polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simple brin par électrophorèse capillaire « *Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism* »

CG-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Chr : chrysène

C_{libre} : concentration en micropolluants dans la fraction libre

CMR : cancérigène, mutagène, reprotoxique

CNTP : conditions normales de pression et température

CoA : Coenzyme A

COHV : composés organo-halogénés volatils

cor : coefficient de corrélation

COV : composés organiques volatils

C_{part} : concentration en micropolluants dans la fraction particulaire

CPG (GC): chromatographie en phase gazeuse

CTO : composé trace organique

cva: charge volumique appliquée

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DBA: dibenzo(a,h)anthracène

DCMe : dichlorométhane

DCM : matière dissoute et colloïdale

DCO (COD): Demande chimique en oxygène

dNTP : désoxynucléotides triphosphate

ddNTP : didésoxynucléotides triphosphate

DEHP : Di(2-éthylhexyl)phtalate

DGGE : électrophorèse sur gel en gradient dénaturant

DHT : dihydrotestostérone

DMSO : diméthylsulfoxyde

DSol : désigne la boue ou le réacteur en le réacteur en lui-même inoculé par des microorganismes provenant d'un sol contaminé en HAP

DSed : désigne la boue ou le réacteur en le réacteur en lui-même inoculé par des microorganismes provenant d'un sédiment contaminé en PCB

DBoue : désigne la boue ou le réacteur en le réacteur en lui-même inoculé par des microorganismes provenant d'une boue anaérobie ou

EC₅₀, EC₂₅, EC₂₀ : concentration effective à 50, 25, 20 %

EPS : exopolymère

ER : récepteur des œstrogènes

EROD : 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase

F_{lu} : fluorène

Fluora : fluoranthène

GC-ECD : chromatographie gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électrons

GR : récepteur des glucocorticoïdes

HAP (PAH)^o : hydrocarbure aromatique polycyclique

HMW : haut poids moléculaire

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

Ic₄ : iso-butyrate

IC₅ : iso-valérate

Ind (ou Indeno) : indeno(1,2,3,c,d)pyrène

INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des Risques

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IRMS : spectrométrie de masse par ratio isotopique

IRSTEA : Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture

JEA : Japan Environment Agency

K_{DCM} : constante d'équilibre de sorption à la DCM (unité de volume/unité de masse de DCM)

K_{ow} : coefficient de partage octanol-eau (hydrophobicité)

K_{part} : constante d'équilibre de sorption aux particules (unité de volume/unité de masse de particule)

LAS : alkylbenzènesulfonate à chaîne linéaire

LMW : faible poids moléculaire

LPTC : Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement

MEEDDM : ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie

MES : matière sèche du compartiment particulaire

MES : matières en suspension

MMW : poids moléculaire moyen

MO (OM) : matière organique

MS (DM) : matière sèche

MV (VS) : matière volatile (synonyme de MO)

Abréviations et symboles

MW : poids moléculaire

Na : non analysé ou non analysable

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH : forme réduite du NADP

NanoSIMS : analyse spatiale par spectrométrie de masse d'ion secondaire

Nb : nombre

nC : nombre de carbone

nd : non détectable ou non détecté

NGS : nouvelle génération de séquençage

NP : nonylphénol

NP1EO : nonylphénol monoxyolate

NP2EO : nonylphénol diéthoxyolate

NPEC : nonylphénol éthoxycarboxylé

NPEO : nonylphénol poly-éthoxylé

nr : non renseigné

OSPAR: Oslo and Paris commission

OTU : unité taxonomique opérationnelle

PBDE : polybromodiphényléther

pb : paire de bases

PCB : polychlorobiphényle

PCDD : polychlorobenzodioxine (dioxine)

PCDF : polychlorodibenzofurane (dioxine)

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PE : perturbateur endocrinien

Phe : phénanthrène

PNAR : programme national d'action contre la pollution des milieux aquatiques

PNSE : plan national santé en environnement

POP : polluant organique persistant

PVPP : poly vinyl poly pyrrolidone

PXR : pregnane X récepteur

Pyr : pyrène

pyro : pyroséquençage

Q : débit

Q-PCR: réaction à polymérisation de chaîne – quantitative

RMN : *résonance magnétique nucléaire*

SAB : sérum albumine bovine

SIP : stable isotope probing

SNK : test de Student Newman Keuls

SPME : micro-extraction sur phase solide

STEP : station d'épuration

STPP : triphosphate pentasodique

T^{°C} : température

TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine

TEQ : toxique équivalent

TGGE : électrophorèse sur gel avec gradient de température

TNPP : trinonylphénol phosphite

t_R : temps de rétention

T-RFLP : Polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux

TSH (HRT): temps de séjour hydraulique

t-test : test de student

TTGE : temporal temperature gel electrophoresis

U**KEA**: United Kingdom Environment Agency

USEPA : United States Environmental Protection Agency

UV : ultra violet

V : volume

W**WF**: World Wildlife Fund

LISTES DES COMMUNICATIONS

Publications dans des journaux soumis à comité de lecture:

Braun, F., Gévaudan, G., Hamelin, J., Patureau, D., (2011). Development and application of an enzymatic and cell flotation treatment for the recovery of viable microbial cells from environmental matrices such as anaerobic sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (24), 8487–8493.

Barret, M., Delgadillo-Mirquez, L., Trably, E., **Braun, F.**, Cea-Barcia, G., Steyer, J., Patureau, D., (2012). Anaerobic Removal of Trace Organic Contaminants in Sewage Sludge: 15 Years of Experience. *Pedosphere* 22 (4), 508–517.

Communication orale (orateur):

Braun F., Hamelin J., Bonnafous A., Steyer JP., Patureau D. Organic micropollutant degradation under anaerobic mesophilic conditions with respect to the inoculum origin. 23rd International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds. Sept 4-8 2011. Münster, Germany.

Barret, M., Delgadillo-Mirquez, L., Trably E., Delgenes, N., **Braun, F.**, Cea Barcia, G., Steyer, J.P. and Patureau, D. (2012) Persistent and emerging pollutants removal under anaerobic conditions: 15 years of experience. EcoSTP conference “Ecotechnologies for Wastewater Treatment. Technical, Environmental and Economic Challenges”, Saint-Jacques de Compostèlle, 25-27 juin 2012. Texte intégral

Posters (personne ayant présenté le poster):

Braun, F., Carrère, H., Hamelin, J., Patureau, D.. PecMicMog : Les interactions Perturbateurs EndoCrinien-MICroorganismes et Matière ORGaniques, moteurs de l'écodynamique et de l'impact des polluants au sein d'écosystèmes épuratoires. Juin 2010. Journée de l'école doctorale Sciences des Procédés, Sciences des Aliments, Montpellier, France.

Braun, F., Cea-Barcia, G, Delgadillo, L., Carrère, H., Hamelin, J., Lardon, L., Steyer, J.P., Patureau, D.. Approche intégrée et pluridisciplinaire de la dégradation des perturbateurs endocriniens dans un procédé modèle de digestion anaérobie de boue urbaine. Juin 2011. Journée de l'école doctorale Sciences des Procédés, Sciences des Aliments, Montpellier, France.

Braun, F., Hamelin, J., Steyer, J.P., Patureau D. Organic micropollutants degradation under anaerobic mesophilic conditions with respect to the inoculum origin. 1st International Conference on Biogas Microbiology. Sept 14-16 2011. Leipzig, Germany

Braun, F., Hamelin, J., Steyer, J.P., Patureau, D. Organic micropollutants degradation in methanogenic mesophilic conditions by different microbial communities. 14th International Symposium on Microbial Ecology, ISME14, The Power of the Small. Aout 19-24 2012. Copenhagen, Denmark

Braun, F., Delgenes, N., Creusot, N., Ait-Aissa, S., Le Menach, K., Budzinski, H., Hamelin, J., Patureau, D. Chemical and toxicological assessments of anaerobic digesters removing EDCs. PNRPE- Recent advances on the environmental and health effects of endocrine disrupters. Dec 10-11 2012, Paris, France.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I.1. LES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES, PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	9
<i>I.1.1. Définition</i>	9
<i>I.1.2. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens</i>	10
I.1.2.1. Le système endocrinien, cible des perturbateurs endocriniens	10
I.1.2.2. Modes d'actions des perturbateurs endocriniens.....	11
I.1.2.2.1. Les actions directes	11
I.1.2.2.2. Les actions indirectes	11
<i>I.1.3. Les perturbateurs endocriniens étudiés</i>	11
I.1.3.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	12
I.1.3.1.1. Définition et structure.....	12
I.1.3.1.1. Sources et expositions	12
I.1.3.2. Les polychlorobiphényles	13
I.1.3.2.1. Définition et structure.....	13
I.1.3.2.2. Sources et expositions	14
I.1.3.3. Les nonylphénols.....	15
I.1.3.3.1. Définitions et structure	15
I.1.3.3.2. Sources.....	16
<i>I.1.4. Contexte réglementaire lié à l'impact toxicologique des trois familles de micropolluants étudiées</i>	17
<i>I.1.5. Outils de contrôle et d'évaluation des risques écotoxicologiques</i>	20
I.1.5.1. Performances et limites des outils de chimie analytique	20
I.1.5.2. Evaluation de l'activité endocrinienne d'échantillons environnementaux	21
I.1.5.2.1. Tests in vivo.....	21
I.1.5.2.2. Test in vitro	22
I.1.5.2.2.1. Mesure de l'activité œstrogénique par la lignée cellulaire MELN	23
I.1.5.2.2.2. Mesure de l'activité androgénique et glucocorticoïde par la lignée cellulaire MDA-kb2	24
I.1.5.2.2.3. Mesure de l'activité dioxin-like et HAP-like par la lignée cellulaire PLHC-1	25
I.2. LES STATIONS D'ÉPURATION POINT DE CONVERGENCE DES MICROPOLLUANTS	27
<i>I.2.1. Le fonctionnement d'une station d'épuration</i>	27
I.2.1.1. Le traitement des eaux usées.....	27
I.2.1.2. Le traitement des boues.....	28
I.2.1.3. La valorisation et/ou l'élimination des boues	29
<i>I.2.2. Devenir des HAP, PCB et NP dans les stations d'épuration</i>	30
<i>I.2.3. La digestion anaérobie</i>	33
I.2.3.1. Principe général.....	33
I.2.3.2. Les étapes de la digestion anaérobie et ses acteurs	34
I.3. LA DÉGRADATION DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES.....	36
<i>I.3.1. En condition aérobie</i>	36
I.3.1.1. Les molécules mono-aromatiques.....	36
I.3.1.2. Les molécules poly-aromatiques	38
I.3.1.2.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	38
I.3.1.2.2. Les polychlorobiphényles.....	38
<i>I.3.2. En conditions anoxiques</i>	39
I.3.2.1. Les molécules mono-aromatiques	39
I.3.2.2. Les molécules poly-aromatiques	43
I.4. L'ÉTUDE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES.....	49
<i>I.4.1. Les études en microcosme versus systèmes réels</i>	49

Table des matières

1.4.2. Appréhender l'étude des communautés microbiennes	49
1.4.3. Les outils d'étude des communautés microbiennes	50
1.4.3.1. La quantification	51
1.4.3.2. Les empreintes moléculaires	52
1.4.3.3. Le séquençage	53
1.5. PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE	55
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES	59
II.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL DES REACTEURS ANAEROBIES	61
II.1.1. Préparation d'un lot homogène de boue pour l'alimentation des réacteurs	61
II.1.1.1. Dilution de la boue	61
II.1.1.2. Dopage de la boue.....	62
II.1.1.3. Stérilisation de la boue	62
II.1.1.4. Caractérisation de la boue stérilisée et test d'activité microbienne	63
II.1.1.4.1. Caractérisation de la boue dopée et stérilisée.....	63
II.1.1.4.1.1 Dosage des protéines.....	63
II.1.1.4.1.2 Dosage des glucides	64
II.1.1.4.2. Test d'activité microbienne.....	64
II.1.2. Extraction des communautés microbiennes issues de trois environnements contrastés.....	64
II.1.2.1. Prétraitement enzymatique de la boue (Braun et al., 2011)	65
II.1.2.2. Application d'un gradient de densité (Braun et al., 2011).....	65
II.1.3. Les réacteurs anaérobies.....	66
II.2. SUIVI DES PARAMETRES DES REACTEURS ANAEROBIES	68
II.2.1. Mesure de la matière sèche et de la matière organique.....	68
II.2.2. Mesure de la demande chimique en oxygène (DCO)	68
II.2.3. Quantification et analyse du biogaz	69
II.2.3.1. Analyse de la composition du biogaz	69
II.2.3.2. Quantification du biogaz produit par suivi de pression	69
II.2.3.3. Quantification du biogaz produit par l'utilisation d'une éprouvette renversée.....	70
II.2.4. Mesure de la concentration en acides gras volatiles (AGV)	71
II.3. DOSAGE DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES.....	71
II.3.1. Préparation des échantillons.....	72
II.3.1.1. Séparation phase particulaire et aqueuse.....	72
II.3.1.2. Lyophilisation	72
II.3.1.3. Broyage	72
II.3.2. Extraction des micropolluants organiques.....	72
II.3.3. Mesure de la concentration en hydrocarbures aromatiques polycycliques	73
II.3.3.1. Sur la boue totale et la phase particulaire.....	73
II.3.3.2. Sur la phase aqueuse.....	74
II.3.4. Mesure de la concentration en nonylphénol.....	77
II.3.4.1. Sur la boue totale et la phase particulaire.....	77
II.3.5. Mesure de la concentration en polychlorobiphényles.....	77
II.3.5.1. Sur la boue totale	77
II.4. ETUDE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES	77
II.4.1. Préparation et conservation des échantillons	78
II.4.2. Extraction de l'ADN	78
II.4.2.1. La lyse cellulaire	78
II.4.2.2. Lavage.....	78
II.4.2.3. Elimination des impuretés.....	79

II.4.2.4. Purification	79
II.4.3. Amplification de l'ADN par PCR	80
II.4.3.1. Amplification de la région V3 de l'ADNr 16S	80
II.4.3.2. Amplification du gène de la benzylsuccinate synthase	81
II.4.3.3. Amplification de la communauté halorespirante.....	81
II.4.3.4. Vérification de l'efficacité d'amplification.....	81
II.4.4. La CE-SSCP (<i>Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism</i>).....	82
II.4.5. Quantification des communautés par PCR quantitative	83
II.4.6. Pyroséquençage	83
II.5. ÉVALUATION DE L'ACTIVITE « PERTURBATEURS ENDOCRINIENS » DES BOUES.....	84
II.5.1. Génération de lignées cellulaires	85
II.5.1.1. La lignée cellulaire MELN.....	85
II.5.1.2. La lignée cellulaire MDA-kb2	85
II.5.1.3. La lignée cellulaire PLHC-1.....	85
II.5.2. Exposition des cellules aux échantillons à analyser	85
II.5.3. Lecture des plaques.....	86
II.5.3.1. Plaques MELN et MDA-kb2	86
II.5.3.2. Plaques PLHC-1.....	86
II.5.4. Analyses des données in vitro	87
II.6. ÉTUDE DE LA DEGRADATION DU PHENANTHRENE PAR ISOTOPIE AU CARBONE 13	87
II.6.1. Maintien des conditions anaérobies et automatisation du dispositif.....	87
II.6.2. Etude en microcosme	88
II.7. ANALYSES DES DONNEES.....	90
II.7.1. Détermination des coefficients de partage des hydrocarbures aromatiques polycycliques	90
II.7.2. Analyses statistiques.....	91
CHAPITRE III. EXTRACTION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES	95
III.1. EXTRACTION DES MICROORGANISMES DES ECOSYSTEMES D'INTERETS	96
III.1.1. Choix des écosystèmes d'intérêts.....	96
III.1.2. Premiers tests d'un protocole d'extraction basé sur un gradient de densité	96
III.2. MISE AU POINT DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DE LA MATRICE BOUE	100
DEVELOPMENT AND APPLICATION OF AN ENZYMATIC AND CELL FLOTATION TREATMENT FOR THE RECOVERY OF VIABLE MICROBIAL CELLS FROM ENVIRONMENTAL MATRICES SUCH AS ANAEROBIC SLUDGE.....	100
III.2.1. Introduction	100
III.2.2. Material and methods	101
III.2.3. Results.....	107
III.2.4. Discussion.....	112
III.3. CONCLUSION.....	115
CHAPITRE IV. ÉTUDE DE LA DEGRADATION DE MICROPOLLUANTS ORGANIQUES PAR 3 INOCULA A MATRICE CONSTANTE	117
IV.1. STERILISATION DE LA BOUE D'ALIMENTATION.....	119
IV.1.1. Choix du mode opératoire.....	119
IV.1.2. Test de différents modes de stérilisation	120
IV.1.3. Conclusion.....	124
IV.2. ÉTUDE DE LA DEGRADATION DES HAP ET PCB.....	126

SIMILAR MICROPOLLUTANTS FATE IN ANAEROBIC DIGESTERS FED WITH THE SAME SLUDGE BUT EXHIBITING DIFFERENT MICROBIAL POPULATIONS AND METABOLIC ROUTES	126
<i>IV.2.1. Introduction</i>	<i>127</i>
<i>IV.2.2. Materials and methods.....</i>	<i>128</i>
IV.2.2.1. Chemicals	128
IV.2.2.2. Reactor inocula and reactor feed preparation.....	129
IV.2.2.2.1. Microbial communities used as inoculum	129
IV.2.2.2.2. Preparation of the sludge to feed the reactor	129
IV.2.2.3. Experimental setup	129
IV.2.2.4. Chemical analyses	130
IV.2.2.5. Removal rate calculation.....	131
IV.2.2.6. Molecular analyses.....	131
IV.2.2.6.1. DNA extraction.....	131
IV.2.2.6.2. Polymerase chain reaction (PCR) amplification	132
IV.2.2.6.3. Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP).....	132
IV.2.2.6.4. Quantitative PCR (q-PCR).....	132
IV.2.2.7. Statistical analyses	133
<i>IV.2.3. Results.....</i>	<i>133</i>
IV.2.3.1. Anaerobic reactor performances	133
IV.2.3.1. PAH and PCB removals.....	135
IV.2.3.2. Changes in abundances of microorganisms	137
IV.2.3.3. Microbial community diversity and structure	138
<i>IV.2.4. Discussion</i>	<i>142</i>
<i>IV.2.5. Conclusion.....</i>	<i>144</i>
IV.3. POUR ALLER PLUS LOIN	145
<i>IV.3.1. Discussions sur le devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques.....</i>	<i>145</i>
<i>IV.3.2. Compléments sur l'étude du devenir des polychlorobiphényles</i>	<i>146</i>
<i>IV.3.3. Etude du devenir des nonylphénols</i>	<i>148</i>
CHAPITRE V. RELATION ENTRE ABONDANCE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES ET FONCTIONNEMENT DES MICROCOSMES	153
V.1. COMMUNAUTES MICROBIENNES ET ACTIVITES MAJORITAIRES AU SEIN DES MICROCOSMES	155
V.1.1. Etude de la diversité des communautés	155
V.1.2. Comparaison de la quantification des microorganismes par pyroséquençage et par Q-PCR....	157
V.1.3. Recherches des espèces discriminant les échantillons.....	158
V.2. COMMUNAUTES MICROBIENNES ET FONCTIONS MINORITAIRES DES MICROCOSMES	163
V.2.1. Etude du potentiel de dégradation du phénanthrène par les microorganismes issus d'un réacteur de méthanisation	164
V.2.2. Etude du potentiel de dégradation des molécules aromatiques	168
V.2.3. Etude de la présence de bactéries capables de déshalogénéation réductrice.....	170
V.3. CONCLUSIONS.....	172
CHAPITRE VI. RELATION ENTRE REPARTITION DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES ET ACTIVITE “PERTURBATEUR ENDOCRINIEN” DANS LES DIFFERENTS COMPARTIMENTS DE LA BOUE	173
VI.1. AVANT-PROPOS.....	175
VI.2. REPARTITION DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES ET AFFINITE POUR LES DIFFERENTS COMPARTIMENTS.	176
VI.2.1. Influence des caractéristiques des molécules sur la répartition des micropolluants	177

Table des matières

VI.2.2. Influence des paramètres de fonctionnement des réacteurs sur la répartition des HAP dans les différents compartiments	177
VI.2.3. Evolution des affinités des micropolluants organiques pour les différents compartiments	180
VI.3. ACTIVITE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS DANS LES DIFFERENTS COMPARTIMENTS.....	183
VI.4. CONCLUSION	188
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	193
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	201
ANNEXES.....	217

LISTE DES FIGURES

Figure 0-1: Représentation des interactions et rétroactions s'opérant entre les trois acteurs du système constitué par les micropolluants organiques dans le procédé de digestion anaérobie, et influence de ces mécanismes sur l'élimination des micropolluants	4
Figure I-1: Système endocrinien (Barbier, 2011)	10
Figure I-2: Formules des 16 HAP considérés comme prioritaires par l'US-EPA.	13
Figure I-3 : Structure chimique du biphényle et des PCB.....	14
Figure I-4: Structure des 7 PCB concernés par l'arrêté du 8 janvier 1998 concernant l'épandage des boues urbaines.....	15
Figure I-5: Structure chimique du nonylphénol et du nonylphénol monoéthoxylé (para)	16
Figure I-6: Exemple de courbe dose réponse.....	22
Figure I-7: Principe du test MELN de mesure de l'activité œstrogénique	24
Figure I-8: Principe du test MDA-kb2 de mesure de l'activité (anti)androgénique et glucocorticoïde	25
Figure I-9: Principe du test PLHC-1 de mesure de l'activité HAP-like et dioxine-like	26
Figure I-10: Organisation schématique d'une station d'épuration	27
Figure I-11: Devenir des micropolluants dans la filière d'épuration.....	31
Figure I-12: Les étapes de la digestion anaérobie.....	34
Figure I-13: Voie métabolique proposée d'ouverture du cycle aromatique du NP (Tuan et al., 2011)	37
Figure I-14: Voie métabolique possible de dégradation aérobie du NP par élimination de la chaîne linéaire (Kohler, et al. 2008)	38
Figure I-15: Voie métabolique de dégradation du biphényle d'après Pieper & Seeger (2008)	40
Figure I-16: Voies possibles de dégradation du benzène d'après Vogt et al. (2011)	41
Figure I-17: Voie possible de dégradation du benzoyl-CoA en acétyl CoA d'après Gibson & Harwood (2002) en condition anoxique.....	41
Figure I-18: Voies possibles de dégradation du naphthalène et du 2-méthyl-naphthalène d'après Meckenstock & Mouttaki (2011) en condition sulfato-réductrice.....	45
Figure I-19: Voie possible de dégradation du phénanthrène en condition sulfato-réductrice d'après Tsai et al. (2009)	46
Figure I-20: Principe de la Q-PCR avec les systèmes SYBR Green (A) et TaqMan (B).....	52
Figure I-21: Principe de la CE SSCP.....	53
Figure I-22: Principe du pyroséquençage.....	55
Figure I-23: Représentation des interactions et rétroactions imposées par le protocole expérimental	57
Figure II-1: Schéma des étapes d'établissement du gradient (Barra Caracciolo et al., 2005)	66
Figure II-2: Un réacteur anaérobie.....	67
Figure II-3: Dispositif expérimental des réacteurs anaérobies	67
Figure II-4: Système SPME (CEA-Barcia, 2012).....	74
Figure II-5: Analyses en bioessais <i>in vitro</i>	84
Figure II-6: Dispositif semi-automatisé de digestion anaérobie	88
Figure II-7: Aperçu des différents tests et analyses effectués sur un échantillon de boue de boue	93
Figure III-1: Gradient de Gentodenz sur un échantillon de sol	97
Figure III-2: Gradient de Gentodenz sur un échantillon de tourbe.....	97
Figure III-3: Gradient de Gentodenz sur un échantillon de boue.....	98
Figure III-4: Schématisation de la structure particulaire de la boue en floc	99
Figure III-5: Schéma de la stratégie de lyse des floccs de la boue par un prétraitement enzymatique	99
Figure III-6: Extraction methodology based on three main steps: initial step, enzymes pre-treatment step and final step.	103
Figure III-7: Density gradient centrifugation tube with the layer of cells extracted from the enzymatically pre-treated sludge.....	104

Liste des figures

Figure III-8: Numeration of 16S gene copies of <i>Bacteria</i> (in grey) and <i>Archaea</i> (in white) by quantitative PCR	108
Figure III-9: The <i>Archaea/Bacteria</i> ratio with respect to enzyme and Gentodenz steps based on numeration by quantitative PCR	109
Figure III-10: Dendrograms displaying genetic distances between bacterial and archaeal communities	110
Figure III-11: Mean CE-SSCP profiles of DNA fragments amplified using primer sets: w49/w104 (Bact) and w274/w275 (Arch).	111
Figure III-12: Biogas production by recovered microbial cells under standard anaerobic test conditions	112
Figure IV-1: Concentration en matière minérale et organique de la boue suivant le mode de stérilisation	122
Figure IV-2: DCO de la boue suivant le mode de stérilisation	122
Figure IV-3: Concentrations protéiques de la boue suivant le mode de stérilisation	123
Figure IV-4: Concentrations glucidiques de la boue suivant le mode de stérilisation	123
Figure IV-5: pH de la boue suivant le mode de stérilisation	124
Figure IV-6: Concentration en HAP et NP suivant le mode de stérilisation	125
Figure IV-7: Boxplot of the anaerobic pollutants removal at steady state according to the inocula	136
Figure IV-8: Representation of PAH fate over the time according to the inoculum	136
Figure IV-9: Enumeration of <i>Bacteria</i> (in left) and <i>Archaea</i> (in right) by Q-PCR.	137
Figure IV-10: Representative of bacterial (on the left) and archaeal (on the right) community CE-SSCP fingerprint based on triplicate reactor at steady state	139
Figure IV-11: Influence of the inoculum origin (soil ▲, sediment ■, sludge ●) on the difference in genetic structure of bacterial (on the left) and archaeal (on the right) communities through a PCA.	140
Figure IV-12: Influence of the inoculum and time on the difference in genetic structure of bacterial (on the left) and archaeal (on the right) communities through a PCA	140
Figure IV-13: Principal Component Analysis (PCA) biplot of bacterial (on the left) and archaeal (on the right) communities	141
Figure IV-14: Dégradation moyenne des PCB sur l'ensemble des réacteurs, en fonction de leur degré de chloration	148
Figure IV-15: Dynamique des abattements en NP au cours du temps (indiqué en Temps de Séjour Hydraulique)	149
Figure IV-16: Dynamique, au cours du temps, des concentrations en NP mesurée en µg/L de boue	150
Figure V-1: Représentation du ratio Archées/Bactéries en fonction de la production de méthane à l'état d'équilibre	158
Figure V-2: Représentation comparée de la discrimination des échantillons par analyse en composantes principales des données de CE-SSCP (en noir) et pyroséquençage (en gris).	159
Figure V-3: Représentation des variables discriminantes sur les analyses en composante principale (ACP) obtenues à partir des données de CE-SSCP (à gauche) et des espèces par pyroséquençage (à droite).	160
Figure V-4: Représentation des paramètres de fonctionnement discriminants sur les analyses en composantes principales (ACP) obtenues à partir des données de SSCP (à gauche) et des proportions des différentes espèces obtenues par pyroséquençage (à droite).	161
Figure V-5: Proportion de chaque espèce d'archées par rapport au nombre total d'archées présents dans les réacteurs	162
Figure V-6: Proportion dans chaque réacteur des 20 espèces les plus abondantes	163
Figure V-7: Fractionnement isotopique ($\delta^{13}\text{C}$ en ‰) du biogaz produit au cours du temps par les microcosmes aux trois concentrations différentes de phénanthrène.	166
Figure V-8: Exemple d'essais d'amplifications du gène <i>bssA</i> d'échantillon de réacteurs à l'état d'équilibre	169
Figure V-9: Exemple d'essais d'amplifications du gène <i>rdh</i> d'échantillons de réacteurs à l'état d'équilibre	171
Figure VI-1: Répartition selon un système à trois compartiments d'un micropolluant organique d'après (Barret, et al. 2010d)	176

Figure VI-2: Répartition des HAP dans le compartiment particulaire et aqueux de la boue et dans les fractions libre et DCM du compartiment aqueux.....	178
Figure VI-3: Répartition des HAP dans la fraction libre et DCM au sein du compartiment aqueux.....	179
Figure VI-4: Affinité des HAP vis-à-vis du compartiment DCM et du compartiment particulaire (exprimé respectivement en $\log K_{DCM}$ et $\log K_{part}$) en fonction de l'hydrophobicité des micropolluants (exprimé en $\log K_{ow}$) dans nos différentes boues (■ Alim, △ DSol, ▲ DSed, ▲ DBoue)	180
Figure VI-5: Spectre de fluorescence 3D des phases aqueuses d'une boue non digérée et d'une boue digérée d'après (Barret, 2009).....	182
Figure VI-6: Comparaison de quatre activités "perturbateur endocrinien" représentatives mesurées dans des extraits de micropolluants issus des différents compartiments de chaque réacteur à l'équilibre	186

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1: Organismes reconnaissant les HAP et PCB et NP comme perturbateurs endocriniens.	17
Tableau I-2: Résumé non exhaustif des différents textes réglementaires attendant aux HAP, PCB et NP étudiés portant essentiellement sur la protection de l'eau	19
Tableau I-3: Exemple de limites de quantification imposées aux laboratoires agréés pour les dosages des PE.	21
Tableau I-4: Récepteurs et ligands de référence dans des lignées cellulaires	23
Tableau I-5: Réglementation pour l'épandage de boues, limite en concentration et en flux pour les micropolluants organiques (arrêté du 8 janvier 1998).....	29
Tableau I-6: Nouvelles valeurs limites en composés organiques proposés par le 3 ^{ème} projet de la révision de la directive de 1986	30
Tableau I-7: Concentration en HAP mesurée dans différentes boues de STEP (mg/kg _{MS})	32
Tableau I-8: Concentration en PCB mesurée dans différentes boues de STEP (mg/kg _{MS})	32
Tableau I-9: Concentration en NP dans des boues secondaires de STEP en mg/kg _{MS}	33
Tableau II-1: Temps de rétention (t _r en min) des HAP par HPLC et couples de longueurs d'onde d'excitation / émission (nm) utilisés pour leur détection par fluorimétrie	74
Tableau II-2: Rendements de quantification des HAP en SPME obtenus suivant les différentes méthodes de calcul.....	76
Tableau II-3: Amorces utilisées lors de l'étude des différentes communautés microbiennes	80
Tableau II-4: Ligands de référence et concentrations (en nM) effectives (EC50) et saturantes (témoin positif dans le bioessai).	87
Tableau II-5: Conditions expérimentales des tests isotopiques.....	89
Tableau III-1: Primers used during CE-SSCP PCR and Q-PCR.....	105
Tableau IV-1: Avantages et inconvénients des techniques de stérilisation	120
Tableau IV-2: Résultats d'activité microbienne suivant le mode de stérilisation suivi	121
Tableau IV-3: Physicochemical characteristics of PAHs and PCBs	131
Tableau IV-4: Anaerobic parameters of the mesophilic bioreactors inoculated with the three microbial populations at steady state	134
Tableau IV-5: Abattements en PCB à l'équilibre dans les différents réacteurs.....	147
Tableau V-1: Données de diversité obtenues par pyroséquençage du gène d'ADNr 16S sur les 9 réacteurs inoculés avec les 3 inocula à l'état d'équilibre (TSH 5).....	156
Tableau V-2: Comparaison des indices de diversité de Simpson (<i>D</i>), Shannon (<i>H</i>) et richesse (<i>R</i>) obtenus par empreinte moléculaire en CE-SSCP et par pyroséquençage.	157
Tableau V-3: Conditions d'amplification PCR testées pour le gène <i>bssA</i> et le gène <i>rdh</i>	170
Tableau VI-1: DCO du compartiment DCM dans les différentes boues digérées	183
Tableau VI-2: Comparaison entre concentrations en HAP et activité <i>HAP-like</i> dans les boues digérée DSol et DBoue	187
TABLEAU VI-3: ACTIVITES <i>HAP-LIKE</i> CALCULEES ET MESUREES (EN BAP-EQ) DANS LA BOUE TOTALE ET DANS LES COMPARTIMENTS (PARTICULAIRE ET AQUEUX) A L'ETAT D'EQUILIBRE.....	189

INTRODUCTION

Les activités anthropiques génèrent le rejet de nombreuses molécules dans notre environnement qui peuvent avoir des impacts et des degrés de toxicité différents sur les écosystèmes. Parmi ces molécules sont retrouvés les micropolluants organiques. Présents dans bon nombre de produits de notre quotidien (produits ménagers, de soin, d'emballage, carburant...), ils induisent une exposition multiple et souvent à faible dose des populations humaines, à l'origine de perturbations endocriniennes, de cancers, de diabète et autres pathologies. Si l'interdiction totale de leur utilisation à la fois industrielle et ménagère paraît illusoire, il est important de surveiller la présence de ces substances dans l'environnement, d'y observer leur devenir et de tenter de les éliminer.

Les systèmes aquatiques se révèlent être particulièrement touchés par ce type de pollution. Nombreuses de ces molécules transitent aussi dans nos systèmes d'épuration qui représentent par là même un point clé de convergence et de dissémination de ces molécules. Les stations d'épuration se définissent aussi comme un lieu privilégié d'action contre les micropolluants organiques, où la diversité des procédés biologiques et physico-chimiques mis en œuvre pourrait aider à réduire les transferts vers les écosystèmes récepteurs.

Au sein de ces systèmes d'épuration, les micropolluants organiques les plus hydrophobes vont se concentrer dans les boues. Or, ces boues, suite à des processus d'hygiénisation et de stabilisation, représentent une source d'amendements organiques intéressante pour les exploitants agricoles. La présence de micropolluants organiques à faibles concentrations dans les boues épandues peut potentiellement entraîner des effets sur les écosystèmes sols et par ruissellement sur les écosystèmes aquatiques.

Différents traitements permettent de stabiliser les boues parmi lesquels la digestion anaérobie. Cette dernière, outre le fait de réduire le volume de boue permet une production renouvelable d'énergie sous forme de biogaz et s'est avérée être un processus d'élimination d'une partie des micropolluants.

Les mécanismes qui régissent la dynamique et donc l'élimination potentielle des micropolluants au sein d'une boue impliquent des interactions fortes entre les trois composantes suivantes (figure 0-1) : les microorganismes, les micropolluants et la matrice (définie par l'ensemble des composés formant la boue autre que les microorganismes vivants).

Les micropolluants et la matrice interagissent via des phénomènes de sorption définissant ainsi la biodisponibilité des molécules au sein de la boue et influençant ainsi leur biodégradation. Un micropolluant est défini biodisponible s'il peut traverser la membrane cellulaire d'un organisme. Par ailleurs, la matrice sert de substrat au métabolisme basal des communautés microbiennes et fournit aussi les substrats permettant la biodégradation des micropolluants par des processus de co-métabolisme. Les microorganismes acteurs de la dégradation via l'expression de différentes fonctions,

définissent le potentiel de biodégradation des micropolluants. Enfin, la toxicité des micropolluants est fortement dépendante de la présence des molécules mais aussi leurs sous-produits de la biodégradation (parfois plus toxique que la molécule mère). L'expression de cette toxicité découle de la biodisponibilité du micropolluant aux organismes. Ces différentes interactions sont souvent abordées dans la littérature deux à deux (sorption matrice/micropolluant ou bien biodégradation/population microbienne) et rares sont les études abordant cette triple interaction.

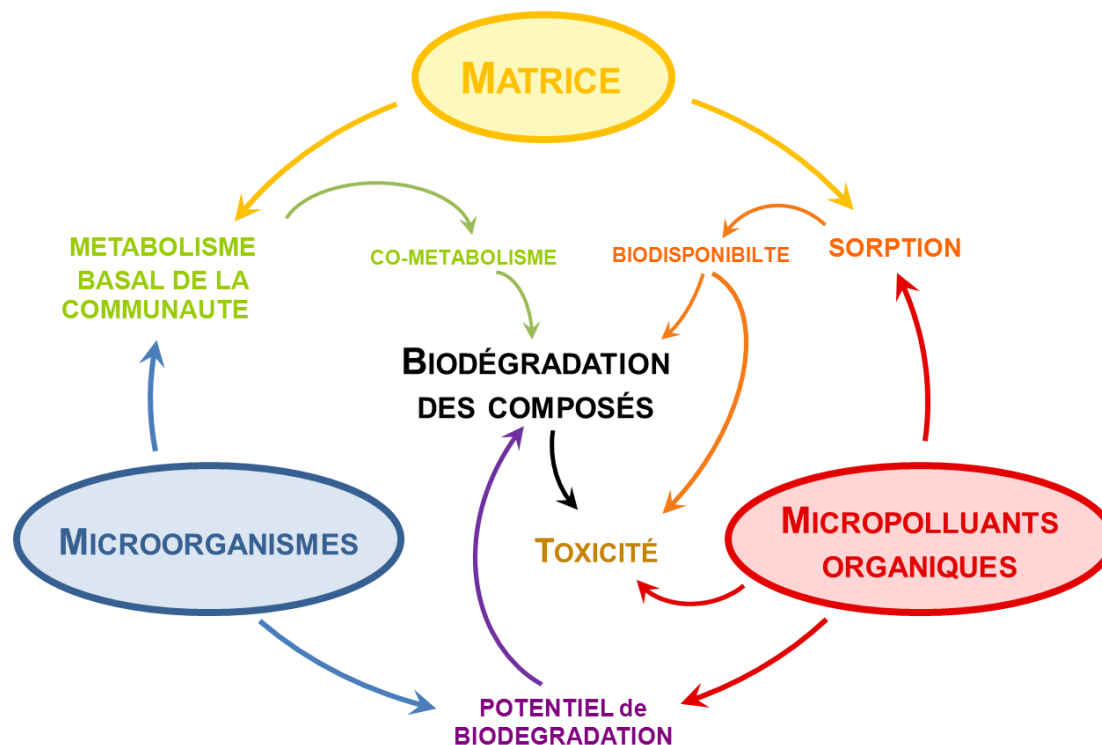


Figure 0-1: Représentation des interactions et rétroactions s'opérant entre les trois acteurs du système constitué par les micropolluants organiques dans le procédé de digestion anaérobie, et influence de ces mécanismes sur l'élimination des micropolluants

Cependant, différentes études menées au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement sur des digesteurs de boues contaminées en micropolluants ont souligné l'importance de considérer l'ensemble des phénomènes dans un double objectif de compréhension des mécanismes et d'optimisation de l'élimination de ces composés. Abordant les interactions entre la matrice et les micropolluants via les phénomènes de sorption et de biodisponibilité, elles ont montré l'importance des caractéristiques biochimiques et structurales de la matrice à la fois pour mieux définir la sorption et la biodisponibilité des micropolluants mais aussi pour mieux appréhender le couplage entre le métabolisme général de l'écosystème et l'élimination des micropolluants au travers du co-métabolisme. La composante "microorganismes" (c'est à dire l'étude des populations microbiennes et fonctions impliquées) a été peu appréhendée. S'ajoute à ceci le fait qu'au regard de la littérature publiée sur les conditions aérobies, celle sur les conditions anaérobies est peu abondante et fortement axée sur des écosystèmes

hypercontaminés. Les travaux de cette thèse souhaitent donc apporter un éclairage nouveau sur la dynamique, la répartition au sein des compartiments matière de la boue (particulaire/ aqueux/ dissout et colloïdal) et la toxicité des micropolluants au cours de la digestion anaérobie de boues faiblement contaminées, en se concentrant essentiellement sur l'étude des « microorganismes », soit l'identification des acteurs et des fonctions. Si en effet, il a été précédemment démontré que des matrices de caractéristiques physico-chimiques différentes peuvent avoir un impact sur la dynamique et l'élimination des micropolluants au sein de la boue, la question principale de cette thèse est de savoir si, sous des conditions opératoires fixes (soit à matrice constante et donc à disponibilité constante), des populations microbiennes différentes peuvent influencer aussi ces mécanismes. Nous tenterons aussi de définir plus précisément comment et par quels acteurs s'exprime chez ces populations microbiennes, le potentiel de dégradation des micropolluants. Au vu des impacts toxiques engendrés par ces molécules sur les organismes, nous chercherons à déterminer si l'expression de la dégradation du couple matrice/micropolluant, sous l'action de communautés différentes, est modifiée en étudiant la répartition des micropolluants dans les différents compartiments et l'expression de la perturbation endocrinienne due aux micropolluants et à leurs sous-produits de dégradation.

Le manuscrit se compose ainsi : le chapitre I est dédié à une revue bibliographique sur un groupe de micropolluants organiques particuliers, les perturbateurs endocriniens, et plus précisément sur trois familles de molécules, objets de cette étude : les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les polychlorobiphényles et le nonylphénol. Au travers de leur description physico-chimique et toxicologique, de données sur leur dynamique au sein des systèmes épuratoires et sur leur dégradation sous diverses conditions, ce chapitre précisera les différents questionnements développés dans ces travaux de recherche. Le matériel et les méthodes employés pour répondre à ces questionnements seront détaillés dans le chapitre II. Le chapitre III expose sous la forme d'une publication, la méthode expérimentale mise au point nous permettant d'extraire des communautés microbiennes différentes de leur écosystème d'origine afin de les étudier dans les mêmes conditions opératoires. Le devenir des micropolluants au cours de la digestion anaérobie avec pour seul paramètre de différenciation des populations microbiennes d'origine contrastée sera exposé en chapitre IV. Une étude plus approfondie des populations microbiennes sera proposée en chapitre V. Enfin, le chapitre VI s'attachera à étudier la dynamique et la toxicité des micropolluants résultant de l'expression des fonctions des différentes populations microbiennes.

Certains résultats obtenus lors de ces travaux de recherche seront présentés sous le format de leur valorisation par publication.

Introduction

Ces recherches ont été menées au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) de l'INRA de Narbonne, au sein de la thématique « Biodisponibilité, Biodégradabilité et Co-traitements ». L'appui de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) et de l'INRA à travers le financement d'une bourse de thèse a permis la réalisation de cette thèse. Par ailleurs, ces travaux s'inscrivent au sein d'un projet de recherche PRNPE (Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens 2010-2013), dont l'objectif est d'apporter des connaissances sur les interactions Perturbateurs EndoCriniens-MICroorganismes et Matières OrGaniques, moteurs de l'écodynamique et de l'impact des polluants au sein d'écosystèmes épuratoires (projet PecMicMog). Ce projet a été financé par l'ADEME et regroupe le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de Narbonne, le Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC) de Bordeaux, l'Institut National de l'Environnement industriel et des Risques de Verneuil-en-Halatte et l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA) d'Antony.

Chapitre I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans le but de définir le contexte de cette étude, nous présenterons et définirons tout d'abord ce qu'est un perturbateur endocrinien, dans quel cadre réglementaire s'inscrit la présence de ces molécules dans notre environnement et les mesures et les outils visant à évaluer et limiter l'exposition des populations à ces substances. Nous présenterons ensuite les connaissances acquises sur le devenir de ces molécules au sein de systèmes d'épuration puis nous exposerons celles acquises sur la dégradation sous condition anaérobie des micropolluants organiques choisis comme objet d'étude. Dans un dernier volet, nous présenterons les méthodes et les outils permettant d'appréhender l'étude des communautés microbiennes d'écosystèmes complexes.

Cette synthèse s'achèvera sur la définition plus précise des objectifs fixés par ce projet de recherche.

I.1. Les micropolluants organiques, perturbateurs endocriniens

Une des conséquences des activités anthropiques est le rejet dans l'environnement d'un grand nombre de polluants aux effets toxiques sur les organismes parmi lesquels les micropolluants perturbateurs endocriniens. Dans ce paragraphe nous nous appliquerons à définir la nature et les sources de ces substances, leur mode d'actions ainsi que le contexte réglementaire auquel elles sont soumises pour en limiter les impacts. Une attention particulière sera apportée aux hydrocarbures aromatiques polycycliques, aux polychlorobiphényles et aux nonylphénols, objets de notre étude. Enfin, nous verrons quels outils écotoxicologiques permettent la bio-surveillance de ces substances.

I.1.1. Définition

En environnement, un polluant est défini comme « un altéragène¹ biologique ou chimique, qui au-delà d'un certain seuil, et parfois dans certaines conditions, développe des impacts négatifs sur tout ou partie d'un écosystème ou de l'Environnement en général ». Plus simplement dit, un polluant est un contaminant d'un ou plusieurs compartiments d'un écosystème et/ou d'un organisme, qui a une incidence au-delà d'un certain seuil ou norme. Ainsi, les micropolluants organiques sont définis comme l'ensemble des molécules organiques toxiques pour les écosystèmes, à des concentrations infimes, de l'ordre du µg ou du ng. Appelés aussi xénobiotiques ou composés traces organiques (CTO), ils se caractérisent principalement par leur toxicité à faible concentration mais certains se révèlent être aussi persistants dans l'environnement, bioaccumulables et transportés sur de longue distance, ils sont alors qualifiés de polluants organiques persistants (POP). Sous le nom de micropolluants organiques se retrouvent des composés chimiques naturels et synthétiques, des composés à usage domestique, agricole et/ou industriel ainsi que des composés utilisés pour la santé humaine et animale. Généralement, ils sont classés en différentes familles : métaux et métalloïdes, hydrocarbures, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychlorobiphényles (PCB), polybromodiphényléther (PBDE), composés organiques volatils (COV), composés organo-halogénés volatils (COHV), composés phénoliques, dioxines et furanes, phtalates ...

Les micropolluants organiques perturbateurs endocriniens sont une sous-catégorie des CTO. Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des molécules qui peuvent altérer les signaux hormonaux et avoir des effets potentiels sur le développement des systèmes reproducteurs et nerveux, sur le métabolisme et l'oncogenèse. Pour prendre en compte

¹ altéragène : "facteur ou substance dont l'introduction dans un environnement en provoque la modification"

l'ensemble de ces effets, différentes définitions sont proposées dont les deux plus connues sont celle de l'Union européenne «*Endocrine disruptors have been defined as exogenous substances that alter function of the endocrine system and consequently cause adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or populations*» et celle de l'USEPA (United States Environment Protection Agency) «*Endocrine disruptors is an exogenous agent that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body that are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development, and/or behaviour*»

I.1.2. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens

I.1.2.1. Le système endocrinien, cible des perturbateurs endocriniens

Le système endocrinien est avec le système nerveux, l'un des deux grands systèmes qui régule la fonction de chaque cellule au sein des organismes pluricellulaires. En effet, il contrôle la croissance, la reproduction, l'homéostasie et le métabolisme des cellules animales.

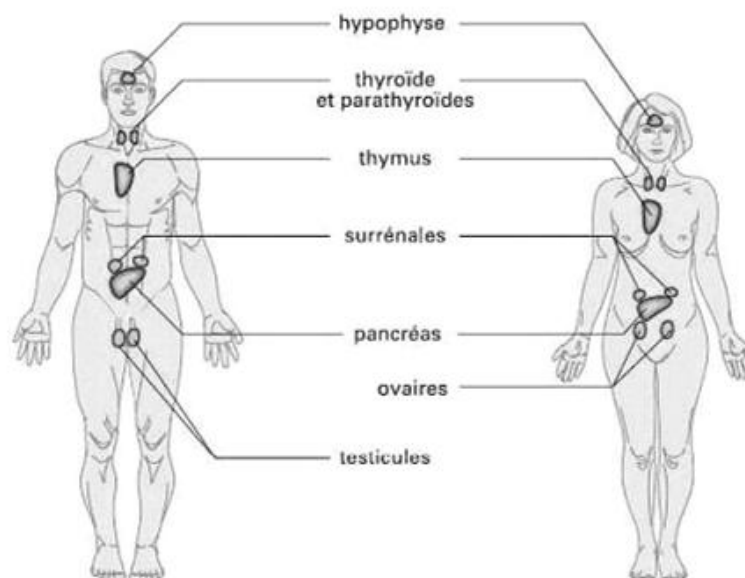


Figure I-1: Système endocrinien (Barbier, 2011)

Il est constitué d'un ensemble de glandes plus précisément appelées glandes endocrines (hypophyse, hypothalamus, thyroïde, thymus, glandes surrénales et parathyroïdes, épiphyse, les gonades, le thymus et le pancréas) qui en réponse à un stimulus sécrètent des messagers chimiques, les hormones (Figure I-1). Ces hormones sont actives à très faibles concentrations et sont transportées par le système sanguin jusqu'à leurs cibles. Les cellules cibles sont dotées de récepteurs intra ou extracellulaires d'une très grande affinité stérique et chimique pour l'hormone. Une fois que l'hormone est liée à son récepteur (on parle alors de ligand), cette dernière active ensuite un signal induisant une réponse de la cellule comme l'activation de la transcription d'un gène. Des

systèmes de contrôles et rétrocontrôles négatifs permettent une modulation de la réponse des organismes à la modification de leur équilibre hormonal.

I.1.2.2. Modes d'actions des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens peuvent interagir avec le système endocrinien de manières directe ou indirecte.

I.1.2.2.1. Les actions directes

Les perturbations directes du système endocrinien sont liées à la fixation du perturbateur sur les récepteurs hormonaux des cellules cibles. Le plus fréquemment, il s'agit des récepteurs nucléaires qui agissent, au niveau du noyau de la cellule, sur la transcription des gènes.

Une fois lié, le PE peut induire les mêmes effets que l'hormone, on parle alors d'effet agoniste ou alors les empêcher, effet antagoniste. Les actions agonistes des PE interviennent quand la molécule est suffisamment analogue à l'hormone. A des concentrations souvent plus faibles que les hormones endogènes, les PE peuvent déclencher une réponse de la cellule qui à un stade ou un moment inopportun peut avoir des conséquences néfastes sur l'organisme. Dans le cas d'une action antagoniste, les PE se fixent au récepteur sans pour autant déclencher de réponse de la cellule cible mais ils empêchent ainsi la fixation d'hormone naturelle. La sensibilité de la cellule à l'hormone est alors inhibée ou désactivée.

I.1.2.2.2. Les actions indirectes

Certaines substances n'agissent pas directement sur les récepteurs de l'hormone. Elles peuvent par exemple induire des effets d'hypersensibilité à l'hormone endogène en activant et/ou stimulant la production de récepteurs. D'autres peuvent empêcher l'inactivation de l'hormone ou encore inhiber son action au moment opportun en agissant sur le système de régulation notamment le système de boucles de rétroaction négative mise en place par la cellule pour réguler/moduler l'action des hormones. Enfin certaines peuvent même activer les enzymes du catabolisme de l'hormone ou encore interférer avec les protéines responsables du transport des hormones.

I.1.3. Les perturbateurs endocriniens étudiés

Le nombre de molécules reconnues par les organisations internationales telles que l'UKEA (United Kingdom Environment Agency), l'USEPA (United States Environmental Protection Agency), l'OSPAR (Oslo and Paris commission), la JEA (Japan Environment Agency) ou la WWF (World Wildlife Fund) ne cesse d'augmenter. L'USEPA a commencé en 2009 par l'évaluation de 67 produits chimiques et en novembre 2010, une seconde liste de produits chimiques a été publiée. Cette liste reconnaissait 134 substances et

produits chimiques comme perturbateurs endocriniens. Dans ce travail, 3 familles de perturbateurs endocriniens ont été choisies : les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), et les nonylphénols (NP) représentant la classe des alkylphénols. Une des caractéristique leur hydrophobicité, caractérisée par un log Kow (coefficient de partage octanol-eau) élevé qui témoigne de leur capacité à s'accumuler préférentiellement dans la matière organique et plus précisément dans les membranes biologiques des organismes vivants par apport à l'eau.

I.1.3.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

I.1.3.1.1. Définition et structure

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules organiques comportant plusieurs noyaux benzéniques non substitués. L'agencement des cycles peut être linéaire (anthracène), angulaire (fluoranthène) ou groupé (pyrène). Ce sont des composés organiques neutres apolaires. Le nombre de noyaux condensés varient ; en ce qui concerne les 13 HAP choisis pour notre étude, ils en contiennent de 2 à 6 (Figure I-2). Ces molécules font toute partie des 16 HAP reconnus comme substances hautement prioritaires par l'US-EPA.

La classification chimique européenne des CMR reconnaît le benzo[a]pyrène cancérigène, mutagène et toxique pour la reproduction; le benzo[a]anthracène, le benzo[k]fluoranthène et le dibenzo[a,h]anthracène comme cancérigène et le chrysène comme cancérigène et mutagène (<http://www.substitution-cmr.fr/>).

I.1.3.1.1. Sources et expositions

Les HAP peuvent être naturellement présents dans l'environnement. En majorité, la formation de ces molécules se fait par une combustion partielle de la matière organique. Les HAP peuvent être synthétisés à partir d'hydrocarbures saturés sous faible conditions d'oxygène. La pyro-synthèse et la pyrolyse sont les deux mécanismes principaux qui peuvent expliquer la formation des HAP. Ainsi des événements naturels comme des feux de forêt, une activité volcanique ou des processus géochimiques peuvent en être à l'origine. Cependant, depuis l'avènement de l'ère industrielle, ces sources naturelles d'émission paraissent négligeables. Aujourd'hui, la majorité des émissions de HAP est d'origine anthropique. Ils sont principalement formés au cours des activités humaines telles que la combustion de combustibles fossiles ou de bois, l'incinération des déchets, l'utilisation du charbon, et le raffinage du pétrole (Lu et al., 2011). Les HAP sont également trouvés dans le goudron, le pétrole brut, la créosote et dans la production de teintures, de plastiques et de pesticides (Ravindra et al., 2008). Couramment, la population humaine est donc exposée à ces molécules que ce soit par exemple lors de l'utilisation de véhicules (Gunawardena et al., 2012), ou lors de la

consommation de tabac (Ding et al., 2007) ou de nourriture. En effet, des HAP ont été retrouvés dans des produits alimentaires telles que les produits grillés (viandes, poissons, pain) (Rey-Salgueiro et al., 2008; Dost and Ideli, 2012), des huiles végétales (Dost and Ideli, 2012), le café (Houessou et al., 2008) et même le lait (Naccari et al., 2011). L'alimentation apparaît comme la principale voie d'exposition des populations humaines à ces substances. Ce sont des polluants ubiquistes que l'on retrouve aussi bien dans l'air, les eaux, les sols et les sédiments (Srogi, 2007).

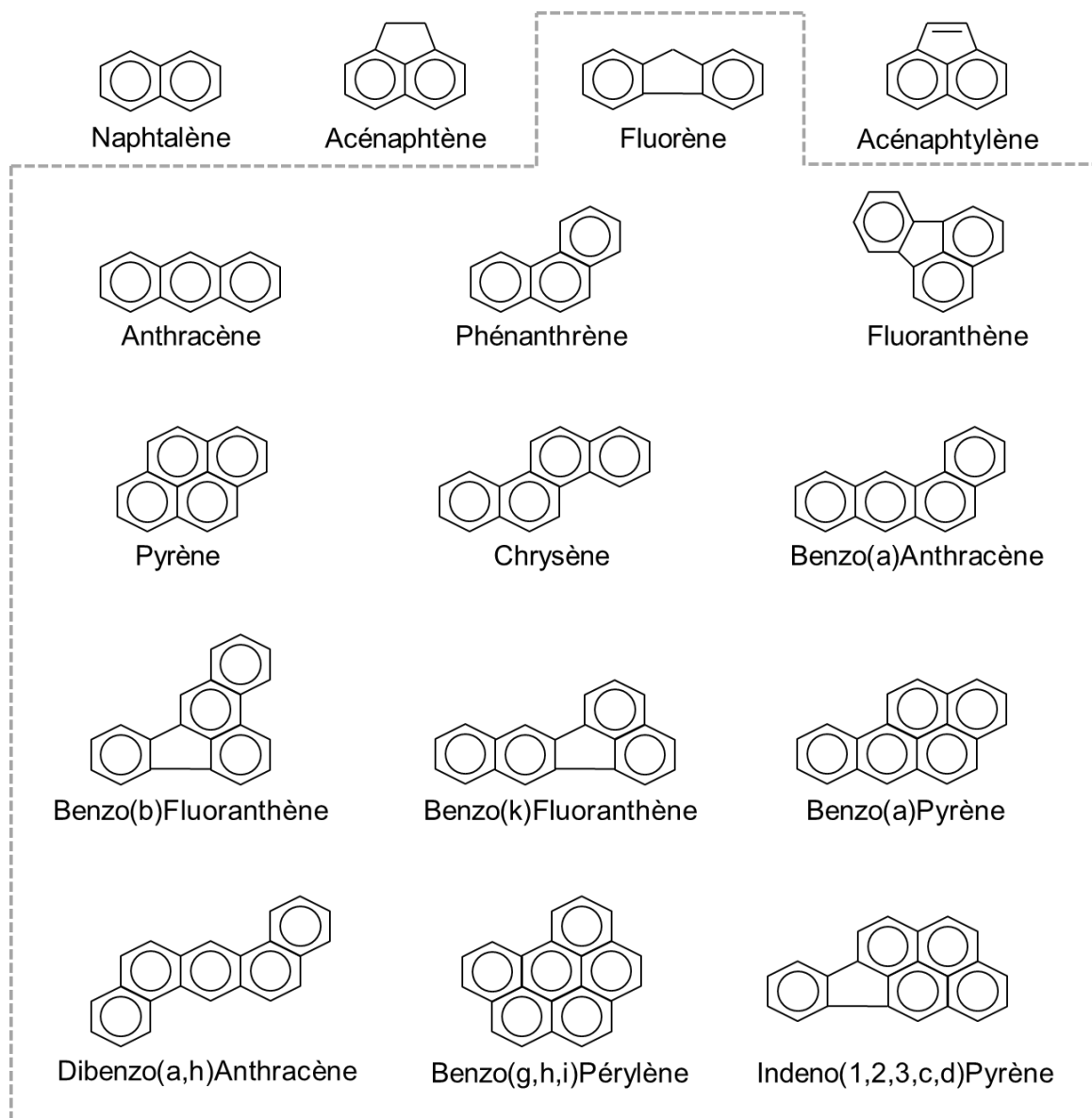


Figure I-2: Formules des 16 HAP considérés comme prioritaires par l'US-EPA.

Les 13 HAP étudiés sont encadrés

I.1.3.2. Les polychlorobiphényles

I.1.3.2.1. *Définition et structure*

Synthèse bibliographique

Les PolyChloroBiphényles (PCB) constituent une famille de composés aromatiques organochlorés dérivés du biphényle industriellement synthétisé, proches des polychloroterphényles, polychlorodibenzo-furanes et des dioxines (Figure I-3). La structure mère de ces molécules est une molécule biphényle sur laquelle se trouve un nombre variable de substitutions chlorées. Plus de 209 structures sont théoriquement possibles mais seulement une centaine d'entre elles peuvent être synthétisées à cause de l'instabilité des isomères.

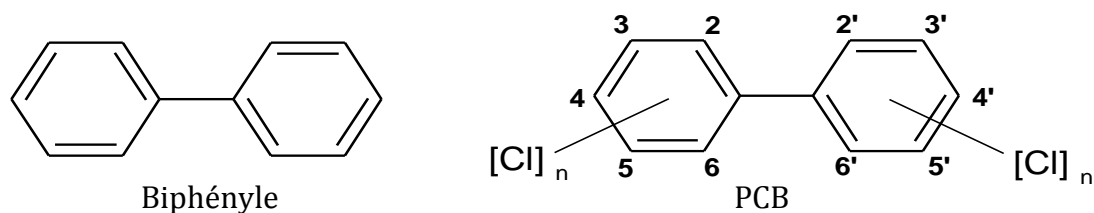


Figure I-3 : Structure chimique du biphényle et des PCB

Parmi les 209 PCB, seulement sept d'entre eux, sont retenus par la réglementation française comme indicateur des composés résistants à la biodégradation et sont soumis à la réglementation au niveau des boues avant épandage : les PCB n°28 (3 Cl) ; n°52 (4 Cl) ; n°101 et 118 (5 Cl) ; n°138 et 153 (6 Cl) ; n°180 (7 Cl). Ce sont sur ces PCB, produits très persistants et qui font craindre une accumulation dans le sol, que portera notre étude (Figure 1-4).

I.1.3.2.2. *Sources et expositions*

De par leur propriété isolante et leur stabilité thermique, ce sont des fluides très utilisés par exemple comme biocides dans les produits de nettoyage (chlorobenzène ou chlorophénol) ou les produits de traitements du bois. Ce sont des substances huileuses ou solides dont l'inertie chimique et thermique dépend du degré de chloration. Ils ont été utilisés dans les circuits fermés de transformateurs ou comme plastifiants dans certaines résines ou encore comme fluides hydrauliques jusqu'en 1970. En France, l'immense majorité des contaminations aux PCB en milieu terrestre n'est imputable qu'aux activités humaines et particulièrement aujourd'hui, à l'utilisation de matériel électrique, à la combustion de la biomasse et à l'incinération de déchets (INERIS, 2011).

Du fait de leur forte hydrophobicité, ils sont accumulés au sein des organismes et leur concentration augmente le long des chaînes trophiques. Les différents organismes s'exposent aux PCB via des produits alimentaires tels que la viande, les produits laitiers, les produits de la mer. Les produits alimentaires représenteraient plus de 90% de l'exposition totale des populations aux PCB (Domingo and Bocio, 2007).

Les PCB sont aussi largement dispersés par transport dans l'air du fait de leur forte volatilité et stabilité. Le mode de transport diffère selon leurs caractéristiques. Les plus chlorés, avec un log Kow supérieur à 6, sont associés à la matière particulaire des sols et des sédiments et dispersés ensuite dans l'atmosphère, alors que les moins chlorés, peuvent exister sous forme gazeuse. Quelle que soit leur forme de transport, ils peuvent être transportés sur de longues distances.

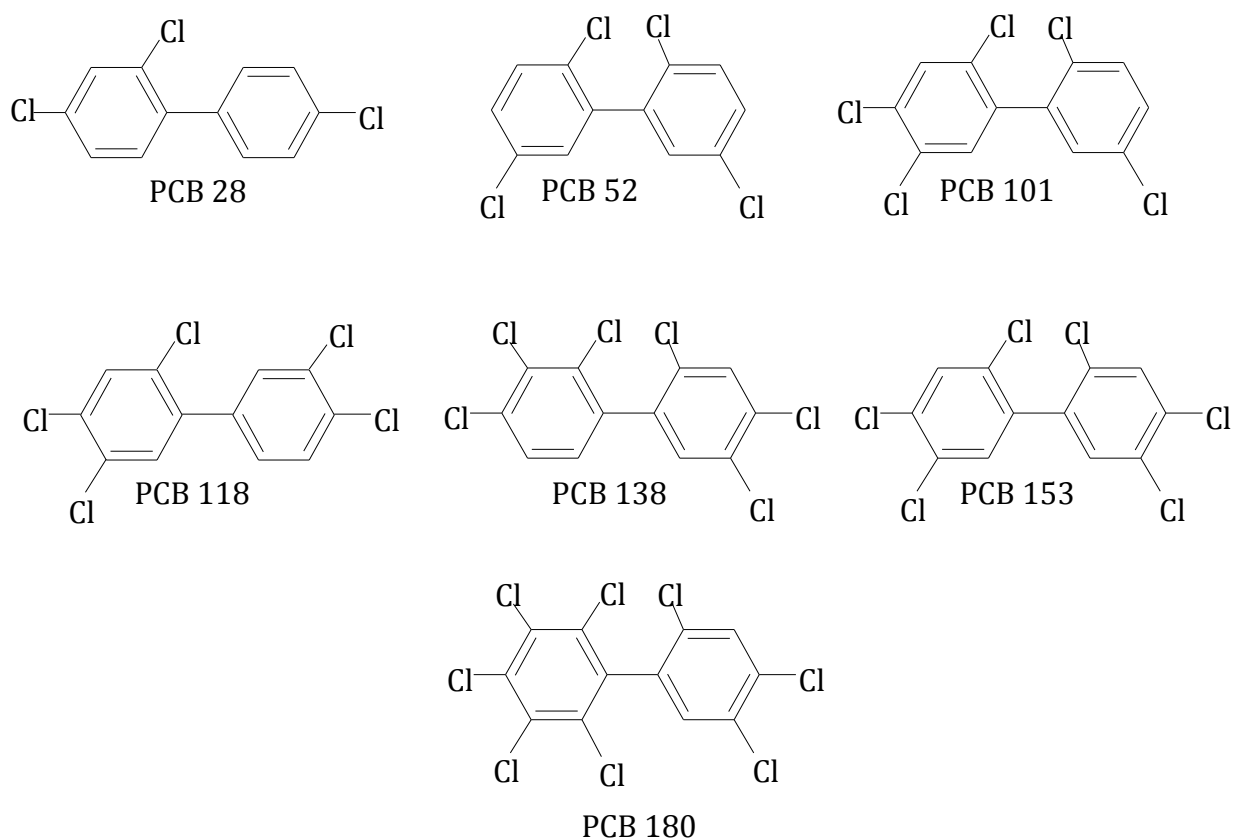


Figure I-4: Structure des 7 PCB concernés par l'arrêté du 8 janvier 1998 concernant l'épandage des boues urbaines

PCB 28 : 2,4,4'-trichlorobiphényle

PCB52 : 2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle

PCB101 : 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphényle

PCB118 : 2,3,4,4',5-pentachlorobiphényle

PCB138 : 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphényle

PCB153 : 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle

PCB180 : 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphényle

I.1.3.3. Les nonylphénols

I.1.3.3.1. Définitions et structure

Les nonylphénols recouvrent un grand nombre d'isomères différents, de formule $C_6H_4(OH)C_9H_{19}$. Ils appartiennent à la famille des alkylphénols. Ce sont des produits chimiques intermédiaires composés d'un anneau phénolique attaché à un groupe nonyl lipophile linéaire ou, plus couramment, ramifié. Les nonylphénols sont des produits de dégradation des surfactants de type alkylphénol éthoxylés.

Le 4-nonylphénol (mélange de nonylphénols à chaîne ramifiée substitués en position 4 sur le noyau), représente la grande majorité des nonylphénols (80 %) dans les mélanges techniques commerciaux. Les nonylphénols sont les précurseurs dans la

fabrication des nonylphénols poly-éthoxylés, ou NPEO (Figure I-5) (par addition de groupes éthoxylates, jusqu'à une centaine), des oximes phénoliques et de certaines matières plastiques (résines formophénoliques, trinonylphénol phosphite TNPP, époxi...). Les oximes phénoliques sont utilisées pour la purification du minerai de cuivre. Les résines formophénoliques sont incorporées à des produits de l'industrie d'extraction du pétrole, le TNPP est, quant à lui, utilisé comme additif pour la coloration et en amélioration des performances dans certains plastiques comme le PVC. Le nonylphénol est utilisé comme catalyseur, durcisseur dans la fabrication de résines époxy solides. Il est aussi utilisé dans la fabrication de résines liquides (peinture, vernis, etc.). Les NPEO sont présents dans différents secteurs industriels (nettoyage, fabrication de produit phytosanitaires et engrais, tannerie, textile, métallurgie, production de papier) mais aussi chez les particuliers via les produits de nettoyages domestiques, de véhicule et les produits cosmétiques (INERIS, 2005).

Les NP et le 4-nonylphénol font partie des molécules CMR reconnues dans la classification chimique internationale comme toxiques pour la reproduction.

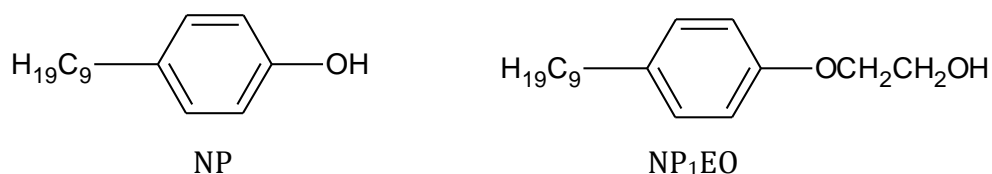


Figure I-5: Structure chimique du nonylphénol et du nonylphénol monoéthoxylé (para)

1.1.3.3.2. Sources

Le NP est rejeté dans l'environnement, principalement par les effluents industriels, les effluents des stations d'épuration des eaux usées, par rejet direct dans les milieux aquatiques mais également par les particuliers.

L'utilisation massive des plastiques, comme moyen de conservation des denrées alimentaires, entraîne une exposition indirecte des populations humaines. De nombreuses études ont montré la possibilité de migration de ces composés de l'emballage à la denrée (Muncke, 2009; Fasano et al., 2012). Les résines, les peintures et les détergents mais aussi les produits phytopharmaceutiques, cosmétiques ou les médicaments vétérinaires sont autant de sources probables de contamination de l'environnement. Les écosystèmes les plus pollués par ces substances sont les écosystèmes aqueux, sédimentaires, et les boues de station d'épuration (Mao et al., 2012). Par contre dans l'air, ces composés ont une courte durée de vie, ils ne sont donc pas considérés comme polluants persistants (comme peuvent l'être les HAP et les PCB), ou soumis à des transports sur de longue distance. Les pollutions atmosphériques enregistrées localement sont donc liées directement à la concentration des activités

anthropiques (Salapasidou et al., 2011). Elles n'en restent pas moins préoccupantes pour la santé humaine et des écosystèmes.

I.1.4. Contexte réglementaire lié à l'impact toxicologique des trois familles de micropolluants étudiées

Depuis plusieurs années, les instances internationales et nationales ont été sensibilisées à la nécessité de mettre en place une bio-surveillance des pollutions engendrées par les xénobiotiques. Les perturbateurs endocriniens sont devenus une préoccupation environnementale de premier plan à partir des années 1990 et il faut attendre 1997 pour voir apparaître la première définition du terme « perturbateur endocrinien » donnée par l'OCDE (Organisme de Coopération et de Développement Economique). Pour pouvoir efficacement limiter les rejets dans l'environnement de ces substances, une prise de conscience et la mise en place de plans d'action à l'échelle la plus large possible est nécessaire.

Différents organismes nationaux et internationaux reconnaissent les HAP, les PCB et les NP comme perturbateurs endocriniens (Tableau I-1).

Tableau I-1: Organismes reconnaissant les HAP et PCB et NP comme perturbateurs endocriniens.

Composé	UKEA	USEPA	OSPAR	JEA	WWF
Nonylphénol	x	x	x	x	x
Polychlorobiphényles	x	x	x	x	x
Hydrocarbures aromatiques polycycliques		x	x		

Au niveau international, les micropolluants sont soumis à deux textes majeurs, le protocole Aarhus et la convention de Stockholm. Le protocole Aarhus est adopté en 1998 et fait suite à la convention de Genève de 1979 sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance. Signé par 39 états sous l'égide de la Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe (CEE-NU), et entré en vigueur en 2003, il vise à contrôler, réduire ou éliminer 16 micropolluants de l'environnement (dont les HAP) en Europe, Amérique du Nord et Asie centrale. Revu en 2009, il prend dès lors en compte les PCB. La convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, signée en mai 2001 par 151 pays, est entrée en vigueur en mai 2004. Elle vise à contrôler, réduire ou éliminer de l'environnement 12 substances (dont les HAP et les PCB). Lors de la 4^{ème} réunion de cette convention de nouvelles substances ont été ajoutées, élevant à 19 le nombre de polluants concernés.

Au niveau européen, il n'existe pas de texte spécifique sur les micropolluants. Cependant le règlement européen 850/2004/CE du 29 avril 2004 a permis d'intégrer les

Synthèse bibliographique

dispositions de la convention de Stockholm et du protocole d'Aarhus au sein de la réglementation européenne. Dans le cadre d'une surveillance et d'une préservation des milieux aquatiques, le contrôle, la réduction ou l'élimination des HAP, PCB et NP rentre dans les cadres de plusieurs directives européennes. Les 3 directives principales sur l'eau qui citent les HAP, PCB et NP sont la directive 76/464/CEE (concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté), la directive 2000/60/CE (établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau) et la directive 2008/105/CE (établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau) (Tableau I-2). La limitation des PCB sur le marché et leur modalité d'élimination sont régis par plusieurs directives européennes. Citons en exemple, la directive 96/59/CE du 16/09/1996 concernant l'élimination des PCB, et le règlement 199/2006/CE qui fixe les teneurs maximales en PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires. Il en est de même pour les HAP, leurs émissions sont soumises à législation dans le cadre de directives portant notamment sur l'incinération des déchets (directive 96/61/CE et 200/76/CE) ou sur la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (directive 98/83/CE). Concernant les NP, leur emploi et leur mise sur le marché sont réglementés par la directive 2003/53/CE.

En France, la mise en évidence de la forte toxicité des PCB a conduit dès l'arrêté de 1975 à l'interdiction de leur utilisation dans des applications ouvertes et en 1987 un arrêté interdit, dès lors, la vente de tout appareil contenant ces substances. Pour les HAP, une première régulation de leur rejet dans l'air atmosphérique est apparue en 1998 avec un arrêté réglementant leur émission par les turbines, les moteurs et les chaudières utilisées comme équipement de postcombustion. Récemment, 3 grands plans nationaux (le PNAR, le PNSE I et II et le Plan Micropolluants), incluent les HAP, les PCB et le NP comme substances toxiques à contrôler ou éliminer. Signé en juin 2005, le PNAR est un programme national d'action contre la pollution des milieux aquatiques par les substances dangereuses. Parallèlement, le PNSE (plan National Santé et Environnement) vise, en ce qui concerne les HAP et les PCB à réduire leurs émissions aqueuses et atmosphériques de 30 %, entre 2007 et 2013. Les molécules reconnues comme CMR font aussi partie de ce plan. Enfin récemment, le 13 octobre 2010, un plan national d'action contre la pollution des milieux aquatiques par les micropolluants a été proposé pour la période 2010-2013.

Tableau I-2: Résumé non exhaustif des différents textes réglementaires attachés aux HAP, PCB et NP étudiés portant essentiellement sur la protection de l'eau

(*) Circulaires et arrêtés nationaux relatifs à la réduction des pollutions émises par les installations classées,

(**) Circulaires et arrêtés nationaux visant à identifier, surveiller, réduire et/ou éliminer la pollution des milieux naturels

Substance	Textes nationaux										Textes européennes			Textes internationaux	
	Arrêté du 07/12/2007 (*) Substances soumises à redevance pour pollution diffuse	Arrêté du 31/01/2008 (*) Registre et déclaration annuelle des émissions polluantes et des déchets	Arrêté du 30 juin 2005 (**) Programme national d'action contre la pollution des milieux aquatiques par certaines substances dangereuses	Arrêté du 17/07/2009 (**) Limitation des introductions de polluants dans les eaux souterraines	Arrêté du 25/01/2010 (**) Méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface	Circulaire du 13/07/2006 (**) Surveillance des eaux douces de surface	Circulaire du 05/01/2009 (**) Recherche et réduction des substances dangereuses pour le milieu aquatique	Circulaire du 29 septembre 2010 (**) Relative à la surveillance de la présence au de micropolluants dans les eaux rejetées au traitement des Eaux Usées	PNSE 1 et 2 (2004-2008 2009-2013)	Plan Micropolluants (2010-2013)	Directive 76/464/CEE: Pollution du milieu aquatique par certaines substances dangereuses	Directive 2000/60/CE : Directive Cadre Eau	Directive 2008/105/CE : Normes de qualité environnementales	Protocole Arhénus	Convention de Stockholm : Polluants organiques persistants
HAP			X					X		X		X	X		
Fluorène			X												
Phénanthrène		X	X												
Anthracène		X	X												
Fluoranthène		X	X												
Pyrène			X												
Benzo[a]anthracène			X												
Chrysène			X												
Benzo[b]fluoranthène		X	X												
Benzo[k]fluoranthène		X	X												
Benzo[a]pyrène		X	X												
Dibenzo[a,h]anthracène		X	X												
Benzo[ghi]perylène		X	X												
Indénol[1,2,3-cd]pyrène		X	X												
PCB			X												
PCB 28			X												
PCB 52			X												
PCB 101			X												
PCB 118			X												
PCB 138			X												
PCB 153			X												
PCB 180			X												
Nonylphénol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Les HAP, les PCB et les NP sont aussi concernés par divers arrêtés et circulaires qui visent à surveiller les écosystèmes environnementaux mais aussi à limiter et agir sur les sites industriels comportant des risques et identifiés comme installation classée. Le Tableau I-2 propose une liste non exhaustive de ces arrêtés et décrets de droit français. HAP et PCB sont aussi listés sur dans les textes se rapportant à l'épandage de produits résiduels organiques (boue, composts) sur sol agricole, mais ces textes seront cités dans le paragraphe I.2.1.3 traitant de la valorisation et /ou l'élimination des boues de station d'épuration.

I.1.5. Outils de contrôle et d'évaluation des risques écotoxicologiques

I.1.5.1. Performances et limites des outils de chimie analytique

Afin de contrôler, limiter ou éliminer ces polluants des écosystèmes, il est nécessaire tout d'abord de les détecter. La mesure des concentrations des différents composés présents dans les écosystèmes est rendue possible par de nombreuses méthodes de chimie analytique. Dans un but d'harmoniser les résultats obtenus lors de la surveillance des écosystèmes, ces méthodes analytiques effectuées en routine sont soumises à réglementation que ce soit au niveau des seuils de détection des analyses (Tableau I-3) ou au niveau des protocoles d'échantillonnage, d'extraction et de mesure. Elles permettent de mesurer l'exposition des organismes à des molécules toxiques connues.

Récemment le développement de nouvelles méthodes en chimie analytique a permis de mesurer de nombreuses substances à l'état de trace avec des seuils de sensibilité très performants (inférieur au ng/L). Cependant ces techniques font appel à des appareillages lourds et restent très coûteuses en routine. De plus, cette approche analytique reste limitée à la mesure des molécules déjà identifiées comme problématiques et ignore complètement les effets de mélanges, la présence de sous-produits et/ou d'autres polluants émergents et l'effet toxique sur les organismes. Pour évaluer les risques écotoxicologiques, évaluer la relation dose-réponse entre le composé toxique et sa cible est obligatoire. Les résultats obtenus en chimie analytique doivent donc être complétés par des outils biologiques que représentent les essais de toxicité *in vivo* ou *in vitro*. Ces essais ont pour but d'évaluer la toxicité des substances sur les organismes vivants. Dans le cadre d'études sur les micropolluants perturbateurs endocriniens, les biologistes ont développé un certain nombre d'outils permettant d'évaluer leur activité endocrinienne dans des échantillons environnementaux.

Tableau I-3: Exemple de limites de quantification imposées aux laboratoires agréés pour les dosages des PE

Substances	Milieu aquatique						Rejets		
	Textes réglementaires		LQ (µg/L)				Textes réglementaires		LQ (µg/L)
	Arrêté 25/01/2010 état chimique eaux de surface	Arrêté 17/07/2009 substances dangereuses	Eaux douces	Eaux salines	Sédiments (poids sec)	Biote (poids frais)	Circulaire 05/01/2009	Circulaire DEB 29/09/2010	Eaux résiduaires
Anthracène	x	x	0,01	0,01	ND	ND	x	x	0,01
Benzo(b)fluoranthène	x	x	0,005	0,01	ND	ND	x	x	0,005
Benzo[a]pyrène	x	x	0,01	0,01	ND	ND	x	x	0,01
Benzo[g,h,i]perylène	x	x	0,005	0,001	ND	ND	x	x	0,005
Benzo[k]fluoranthène	x	x	0,005	0,01	ND	ND	x	x	0,005
Fluoranthène	x	x	0,01	0,01	ND	ND	x	x	0,01
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	x	x	0,005	0,001	ND	ND	x	x	0,005
PCB 28		x	ND	ND	ND	ND	x	x	0,005
PCB 52		x	ND	ND	ND	ND	x	x	0,005
PCB 101		x	ND	ND	ND	ND	x	x	0,005
PCB 118		x	ND	ND	ND	ND	x	x	0,005
PCB 138		x	ND	ND	ND	ND	x	x	0,005
PCB 153		x	ND	ND	ND	ND	x	x	0,005
PCB 180		x	ND	ND	ND	ND	x	x	0,005
Nonylphénol		x	ND	ND	ND	ND	x		0,1
4-n-nonylphénol	x		0,1	0,1	ND	ND		x	0,3
NP1EO			ND	ND	ND	ND	x	x	0,1
NP2EO			ND	ND	ND	ND	x	x	0,1

I.1.5.2. Evaluation de l'activité endocrinienne d'échantillons environnementaux.

I.1.5.2.1. *Tests in vivo*

De nombreuses études se sont penchées sur l'effet des micropolluants sur des espèces animales modèles, en condition contrôlée de laboratoire. Ces tests sont appelés tests *in vivo* et permettent d'évaluer l'effet d'une ou plusieurs molécules ou d'échantillons environnementaux sur un organisme vivant. Les critères de perturbation observés sont nombreux et peuvent par exemple être morphologique, physiologique ou cytologique ou génétique. Les modèles utilisés dans le cadre des perturbateurs endocriniens sont le plus souvent des rongeurs, des amphibiens, des crustacés ou des poissons.

Les méthodes d'analyse *in vivo* prennent en compte les aspects de biodisponibilité des micropolluants et les aspects métaboliques, reflétant ainsi bien l'impact de PE sur les espèces cibles. La mise en place de tels protocoles reste pourtant assez lourde et coûteuse d'où le développement de test *in vitro*.

1.1.5.2.2. *Test in vitro*

Les interactions polluants-récepteurs constituent une des étapes clés de la toxicité des micropolluants organiques. Nombre de composés perturbateurs endocriniens sont ainsi capables d'interagir avec différents récepteurs nucléaires tels que les récepteurs des androgènes (AR), œstrogènes (ER), glucocorticoïdes (GR), dioxine (AhR), xénobiotiques (PXR), ou constitutif des androstanes (CAR), et de moduler positivement ou négativement la réponse des gènes cibles de ces récepteurs. Au laboratoire, l'utilisation de modèles cellulaires exprimant un gène marqueur (e.g. gène rapporteur codant pour la luciférase ou gène naturel codant pour le Cyp1A) sous le contrôle transcriptionnel de ces récepteurs, permet une mesure spécifique de l'activation de ces derniers par une simple mesure d'un signal colorimétrique, bioluminescent ou fluorescent. La réponse génétique ainsi mesurée est fonction de la concentration en ligand, effecteur dans l'environnement cellulaire. Elle obéit à une loi dite « dose /réponse », atteignant un plateau quand tous les récepteurs sont saturés par le ligand (Figure I-6).

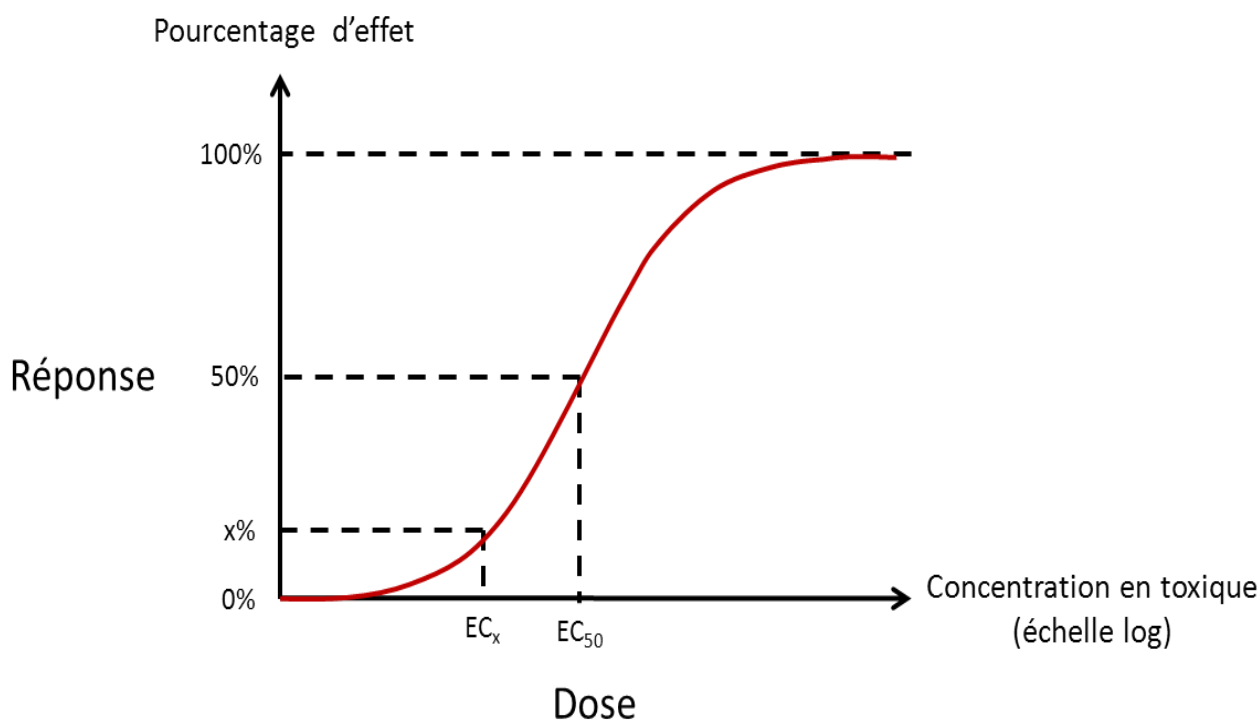


Figure I-6: Exemple de courbe dose réponse

Le potentiel d'activation d'un récepteur se définit comme la quantité de substance nécessaire pour produire un effet donné. Dans la littérature, il est estimé par la concentration produisant différent pourcentage (50, 25, 20) de l'effet maximum (EC_{50} , EC_{25} , EC_{20}). Dans les échantillons environnementaux on mesure une activité en

toxique-équivalent (TEQ) par rapport à l'activité d'un ligand référence qui varie suivant le récepteur étudié (Tableau I-4).

L'activité toxique-équivalent est donnée par la formule :

$$\text{TEQ} = \text{Ref-EQ} = \text{EC}_{20} \text{ REF} / \text{EC}_{20} \text{ échantillon}$$

avec Ref, le ligand de référence du test.

Tableau I-4: Récepteurs et ligands de référence dans des lignées cellulaires

Lignée cellulaire	Récepteur	Ligand de référence
MELN	ER	17 β -E2
MDA-kb2	AR	DHT
PLHC-1	AhR-4h	BaP
PLHC-1	AhR-24h	TCDD

De nombreux modèles cellulaires permettent d'évaluer l'activité de perturbateur endocrinien. Les modèles cellulaires MELN, MDA-kb2 et PLHC-1 décrits ci-après et utilisés dans notre étude permettent d'évaluer l'activité œstrogénique, androgénique/glucocorticoïde ainsi que dioxine-like et HAP-like, respectivement.

I.1.5.2.2.1 Mesure de l'activité œstrogénique par la lignée cellulaire MELN

L'activité œstrogénique est initiée par l'activation de deux récepteurs nucléaires ER α et son isoforme ER β sous l'influence des œstrogènes (ER : *estrogen receptor*). La lignée cellulaire MELN est couramment utilisée pour mesurer une activité œstrogénique (Balaguer et al., 1999). Il s'agit de cellules humaines de lignée MCF-7 de cancer du sein, exprimant de manière endogène le récepteur aux œstrogène ER α , et transfectées de manière stable par le plasmide ERE- β Glob-Luc-SVNeo. Ce vecteur d'expression est composé d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE : *estrogen response element*) et d'un promoteur du gène codant pour la β -Globine (β Glob) placés en amont du gène rapporteur codant pour la luciférase (Luc). Après migration du ligand dans le noyau cellulaire, la fixation de ce dernier au récepteur ER se traduit donc par la production de l'enzyme Luciférase, capable de dégrader la luciférine en oxy-luciférine, molécule luminescente.

Le principe de fonctionnement du test basé sur le récepteur ER est présenté sur la Figure I-7.

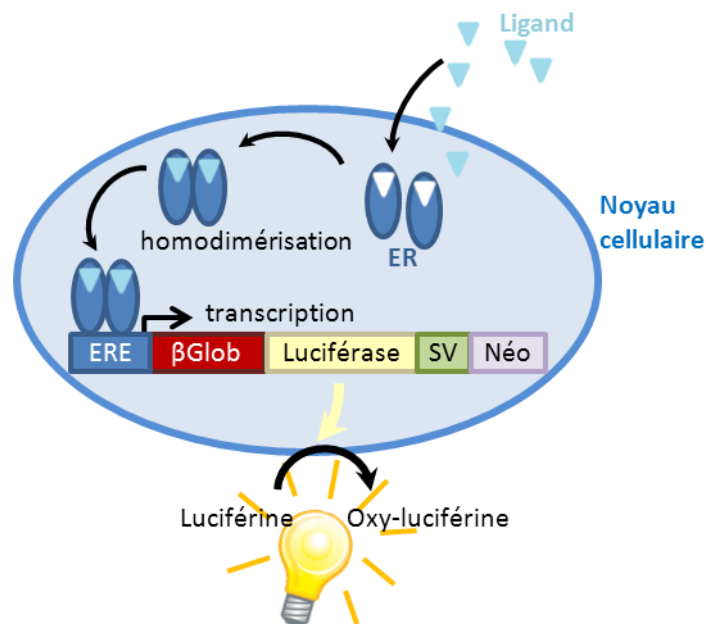


Figure I-7: Principe du test MELN de mesure de l'activité œstrogénique

1.1.5.2.2.2 Mesure de l'activité androgénique et glucocorticoïde par la lignée cellulaire MDA-kb2

L'activité androgénique ou anti-androgénique est initiée par l'activation de récepteurs cellulaires cytosoliques androgéniques (AR) et/ou glucocorticoïdiens (GR). La lignée cellulaire MDA-kb2 est utilisée pour mesurer cette activité (Wilson et al. 2002). Cette lignée cellulaire dérive d'une lignée de cellules épithéliales humaines de cancer du sein (lignée MDA-MB-453) qui exprime de manière endogène le récepteur des androgènes (AR) et le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Wilson et al. 2002). Ces cellules sont transfectées de façon stable par le plasmide pMMTV-Luc-Néo. Ce plasmide est composé du gène rapporteur Luc, placé sous le contrôle transitionnel du promoteur viral MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*). Après fixation du ligand sur AR ou GR, le complexe ligand-récepteur est transloqué dans le noyau cellulaire et active le promoteur du gène rapporteur Luc. Comme précédemment, l'enzyme Luciférase est produite permettant la production d'oxy-luciférine et de lumière.

Le principe de fonctionnement du test basé sur le récepteur AR ou GR est présenté sur la Figure I-8.

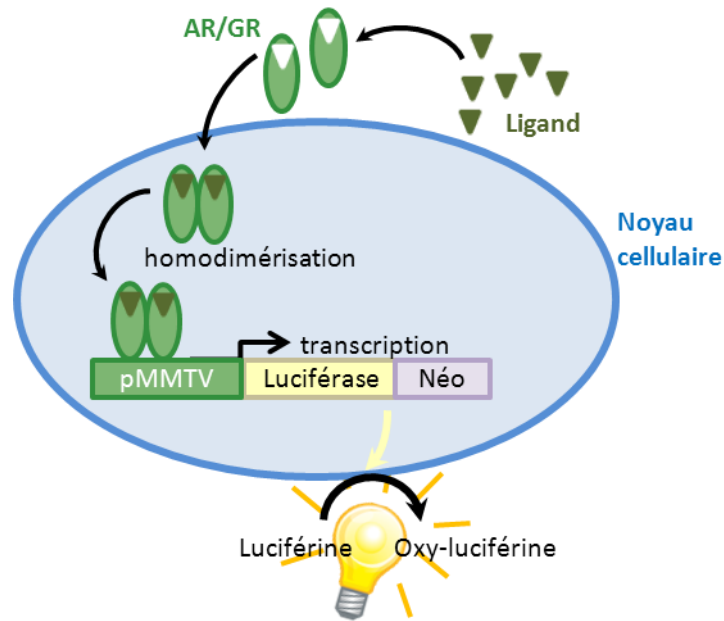


Figure I-8: Principe du test MDA-kb2 de mesure de l'activité (anti)androgénique et glucocorticoïde

I.1.5.2.2.3 Mesure de l'activité dioxin-like et HAP-like par la lignée cellulaire PLHC-1

Les activités *dioxin-like* et *HAP-like* sont initiées par le récepteur cellulaire cytosolique AhR. La lignée cellulaire PLHC-1 est utilisée pour mesurer ces activités (Louiz et al., 2008). Cette lignée cellulaire dérive d'un hépatome (tumeur du foie) de vairon tropical *Poeciliopsis lucida* induit par le diméthylbenzoanthracène (Ryan and Hightower, 1994) exprimant de manière endogène le récepteur AhR. Après fixation du ligand (HAP, PCB, PCDD/F), le récepteur activé est transloqué dans le noyau où il s'hétérodimérise avec le complexe ARNT. C'est ce complexe qui va induire la transcription de différents gènes, parmi lesquels ceux codant pour des enzymes de biotransformation (détoxification) qui *in fine* éliminent des ligands AhR. Ces enzymes, clés de la détoxification sont notamment des enzymes mono-oxygénases (isoformes de la superfamille des cytochromes P450) qui, par oxydation, ont la capacité d'augmenter la solubilité des xénobiotiques. L'induction d'une de ces enzymes, CYP1A1, sert alors d'indicateur d'activation du récepteur AhR et est mesurée au niveau transcriptionnel (ARNm) ou enzymatique (à travers le dosage de l'activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase, EROD). Etant très sensible et très inductible, le dosage de l'activité EROD est une des méthodes les plus utilisées pour quantifier l'activité AhR. Le principe de ce dosage est de mesurer la fluorescence émise par la résorufine, issue de la dééthylation de l'éthoxyrésorufine (7-ERF) catalysée par l'EROD (Burke and Mayer, 1974).

Deux types d'activités peuvent être différenciés grâce à ce dispositif selon le temps d'exposition de la cellule à l'échantillon testé. Une incubation de 4h permettra de prendre en compte l'ensemble des composés actifs y compris ceux rapidement métabolisables comme les HAP, on parle alors d'activité « HAP-like ». Une incubation de 24h permettra de mesurer essentiellement des substances chimiques plus persistantes comme les dioxines ou les furanes, on parlera alors d'activité *dioxin-like*, les composés facilement métabolisables comme les HAP étant majoritairement dégradés après 24h (Louiz et al., 2008).

Le principe de fonctionnement du test basé sur le récepteur AhR est présenté en Figure I-9.

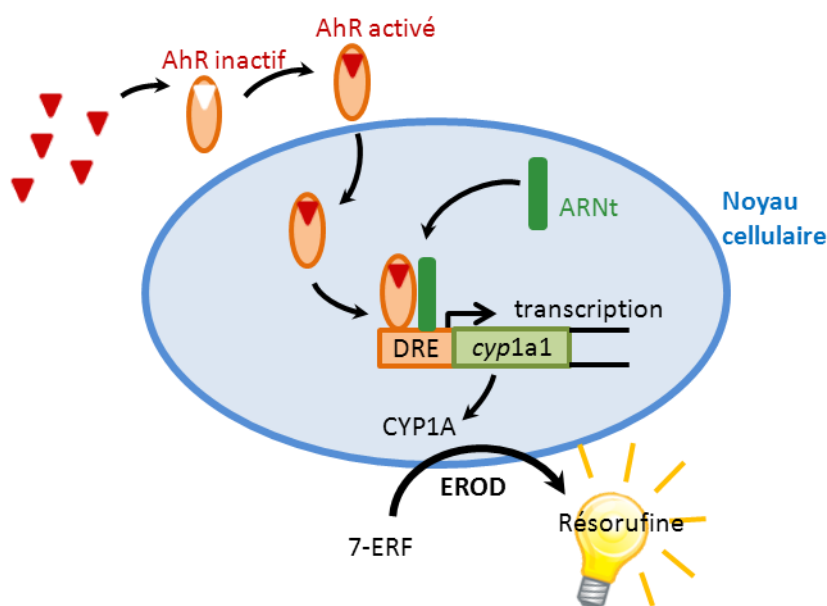


Figure I-9: Principe du test PLHC-1 de mesure de l'activité HAP-like et dioxine-like

Cette première partie montre l'existence dans l'environnement de différentes substances considérées comme perturbateurs endocriniens. La diffusion de ces molécules dans notre environnement est soumise à une surveillance définie par un cadre réglementaire complexe visant entre autre à réduire l'exposition des populations humaine à leurs effets toxiques. Ces micropolluants, présents dans les écosystèmes environnementaux, peuvent être véhiculés par différents modes de transports (aériens, aqueux) et cette pollution peut converger vers des zones où ces substances se retrouvent confinées pendant un temps donné. Dans le paragraphe suivant nous verrons comment les stations d'épuration représentent un point clé de convergence mais aussi d'élimination de ces substances.

I.2. Les stations d'épuration point de convergence des micropolluants

Les micropolluants tels que HAP, PCB et NP sont acheminés vers les stations d'épuration via les eaux domestiques, industrielles et/ou de ruissellement. Les stations d'épuration (STEP) sont donc un lieu privilégié de convergence de ces substances. Dans ce paragraphe, après avoir décrit le fonctionnement général d'une station d'épuration, nous nous intéresserons au devenir des substances étudiées dans ce système et plus particulièrement dans les résidus valorisables de ces systèmes, les boues.

I.2.1. Le fonctionnement d'une station d'épuration

I.2.1.1. Le traitement des eaux usées

Les stations d'épuration (STEP) sont le lieu de convergence des eaux de ruissellement, domestiques et industrielles afin d'y être traitées. L'épuration de ces eaux consiste à réduire la charge en matière organique ainsi que les teneurs en nitrate et/ou phosphate et/ou produits chimiques. Lors de cette étape, il se produit un transfert de pollution de la phase liquide (eau) vers une phase plus concentrée (boue) et une phase gazeuse (CO₂, N₂...). Traditionnellement la filière de traitement de l'eau se décompose en trois parties principales, le prétraitement, le traitement primaire et le traitement secondaire (Figure I-10).

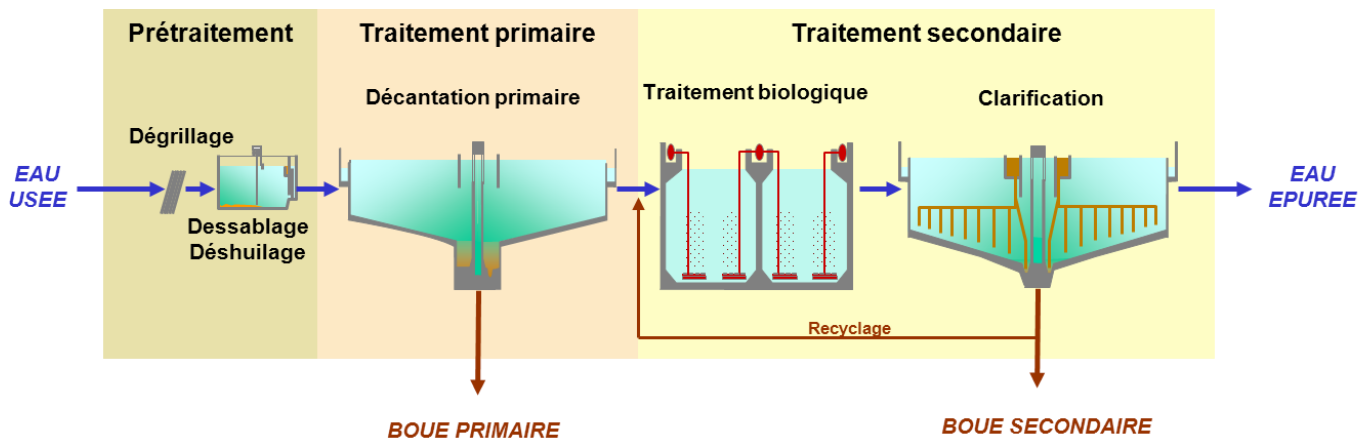


Figure I-10: Organisation schématique d'une station d'épuration

Le prétraitement vise à éliminer les grosses particules de l'eau et se décompose en différentes phases telles que le dégrillage, le dessablage et le déshuilage. Il s'en suit un traitement dit « primaire » dont le but est de récupérer les Matières En Suspension (MES) facilement décantables non retenues lors du prétraitement. La décantation permet d'accumuler 50 à 70% des MES contenues dans les eaux usées. Leur accumulation au fond du décanteur a pour objectif l'obtention d'une boue dite « primaire » à forte charge en matière organique. Cette étape est une étape facultative

qui n'est plus présente sur les stations récentes ni sur les plus petites. Les effluents ainsi traités subissent ensuite un traitement secondaire composé de deux étapes, le traitement biologique et la clarification. Au cours du traitement biologique (qui peut comporter des phases aérobie, anoxique et/ou anaérobie), un consortium bactérien utilise la matière organique présente dans l'effluent comme source de carbone et d'énergie pour se développer ; il en résulte une dépollution de l'effluent. En effet, un changement de phase s'opère ; la matière organique consommée dans la phase liquide est en partie transférée à la fraction solide et à la phase gazeuse. Au cours de la clarification, les boues secondaires ou boues activées (suspension de biomasse et matière réfractaire à l'épuration biologique) sont séparées de l'eau traitée par décantation. Une partie des boues secondaires est recyclée dans le bassin de traitement biologique. Le devenir de la phase liquide peut varier d'une installation à l'autre, soit celle-ci est rejetée dans l'environnement (comme sur la figure), soit elle subit un traitement tertiaire qui consiste principalement à traiter l'azote et le phosphore.

1.2.1.2. Le traitement des boues

Avant de pouvoir être valorisées ou éliminées, les boues collectées en sortie de station d'épuration doivent subir différents traitements. Ces traitements visent à réduire le pouvoir fermentescible des boues, leur quantité ainsi que les risques sanitaires inhérents à leur constitution. Généralement quatre étapes de traitement sont distinguées : l'épaississement, la stabilisation, le conditionnement et la déshydratation.

L'épaississement permet de concentrer les boues. Il est basé sur des techniques de séparation des phases solide et liquide des boues permettant d'obtenir une siccité des boues de l'ordre de 1 à 10%. Il est généralement effectué par décantation ou par flottation, ou par égouttage et centrifugation. L'eau retirée est recyclée en tête de station.

Lors du processus de stabilisation, des méthodes biologiques, chimiques ou physiques permettent de réduire les nuisances olfactives, et la présence de pathogène mais aussi d'inhiber, de réduire ou d'éliminer le pouvoir fermentescible des boues. Les méthodes chimiques (chaulage, oxydation, stabilisation aux nitrites) et les méthodes physiques (chauffage) permettent de réduire la présence de microorganismes pathogènes ou d'inhiber leur action sans diminuer la quantité de matière. L'avantage des techniques biologiques (digestion aérobie, anaérobie, compostage), basées sur une dégradation de la matière organique, est de permettre une hygiénisation plus ou moins avancée des boues tout en réduisant les quantités de matière.

Le conditionnement des boues prépare ces dernières à l'étape finale de déshydratation. Il s'agit de libérer l'eau enfermée dans les floccs par traitement chimique ou chauffage.

La déshydratation des boues s'opère en amont par exemple, des opérations d'incinération, de compostage. Le volume de boue est réduit en éliminant une partie de la fraction d'eau par filtration, centrifugation ou évaporation.

I.2.1.3. La valorisation et/ou l'élimination des boues

Une fois traitées, les boues de STEP peuvent être valorisées sous la forme d'amendement agricole. En effet, les boues sont une source potentielle de carbone et de nutriments leur assurant des propriétés amendantes et/ou fertilisantes. Outre ces propriétés, les boues bien que traitées conservent un pouvoir pathogène et/ou polluant, elles sont donc soumises à une réglementation européenne et nationale. En France, les textes fondateurs de la réglementation pour l'épandage des boues de STEP sont la norme NF U44-041 de 1985 et la directive européenne de 12 juin 1986. Complétée par les arrêtés du 8 janvier 1998, et du 18 mars 2004 et les circulaires du 16 mars 1999 et du 18 avril 2005 et la NF U44-095 (compost de MIATE), elles fixent le cadre réglementaire des pratiques d'épandage et les exigences de qualité des boues. Actuellement 10 micropolluants organiques sont visés par cette législation (7 PCB et 3 HAP) (Tableau I-5).

Tableau I-5: Réglementation pour l'épandage de boues, limite en concentration et en flux pour les micropolluants organiques (arrêté du 8 janvier 1998)

Micropolluants	Concentration limite dans les boues (mg/kg _{MS})	Flux maximum cumulé sur une durée de 10 ans en mg/m ²
PCB*	0,8	1,2
Fluoranthène	5	7,5
Benzo(b)fluoranthèn	2,5	4
Benzo(a)pyrène	2	3

* somme des PCB28, 52, 101, 118, 138, 153,180

En avril 2000, un document de travail de la commission européenne proposait d'intégrer d'autres composés organiques (Tableau I-6).

Outre la valorisation agricole qui représente en France la majorité du devenir des boues, il existe deux autres devenirs pour les boues de STEP : l'incinération qui ne peut s'appliquer qu'à des boues ayant une siccité supérieure ou égale à 30% et la mise en décharge interdite depuis juillet 2002 et réservé désormais aux cendres de boues incinérées. En 2009, en France, 75% des boues produites (1 million de tonnes MS) étaient épandues, 18% incinérées et 7% envoyées en centre d'enfouissement technique (MEEDDM).

Tableau I-6: Nouvelles valeurs limites en composés organiques proposés par le 3^{ème} projet de la révision de la directive de 1986

Composés	Classification	Valeur limites (mg/kg _{MS})
AOX ¹	Composés organique	500
LAS ²	Composés organique	2600
DEHP ³	Composés organique	100
NPE ⁴	Composés organique	50
HAP ⁵	Composés organique	6
PCB ⁶	Composés organique	0,8
PCDD/F ⁷	Dioxines	100 (ngTE/kg _{MS})

¹somme des composés organohalogénés ; ²alkylbenzènesulfonate à chaîne linéaire ; ³Di(2-éthylhexyl)phtalate ; ⁴comprend les NP, NPE10 ; NPE20 ; ⁵somme des PCB28,52,101,118,138,153,180 ; ⁶Somme de 11 HAP : acénaphthène, phénanthrène, fluorène, fluoranthène, pyrène, benzo(b+j+k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, benzo(g,h,i)pérylène, indéno(1, 2, 3-c,d)pyrène ; ⁷Polychlorodibenzodioxines/dibenzofurannes

I.2.2. Devenir des HAP, PCB et NP dans les stations d'épuration

De nombreuses études montrent que les HAP, PCB et NP sont retrouvés dans les eaux usées, les eaux traitées ou les boues. Ainsi, les micropolluants convergent vers la station et sont retrouvés ensuite dans les différents sous-produits de celle-ci que ce soient les eaux traitées ou les boues (Mao et al. 2012; Katsoyiannis & Samara 2004; Blanchard et al. 2004; Tian et al. 2012).

Les abattements en HAP et PCB relevés dans la ligne d'eau des STEP sont le fait de différents mécanismes : volatilisation (transfert à l'atmosphère), sorption et/ou séquestration (transfert vers la ligne boue) et biodégradation (Byrns 2001) (Figure I-11).

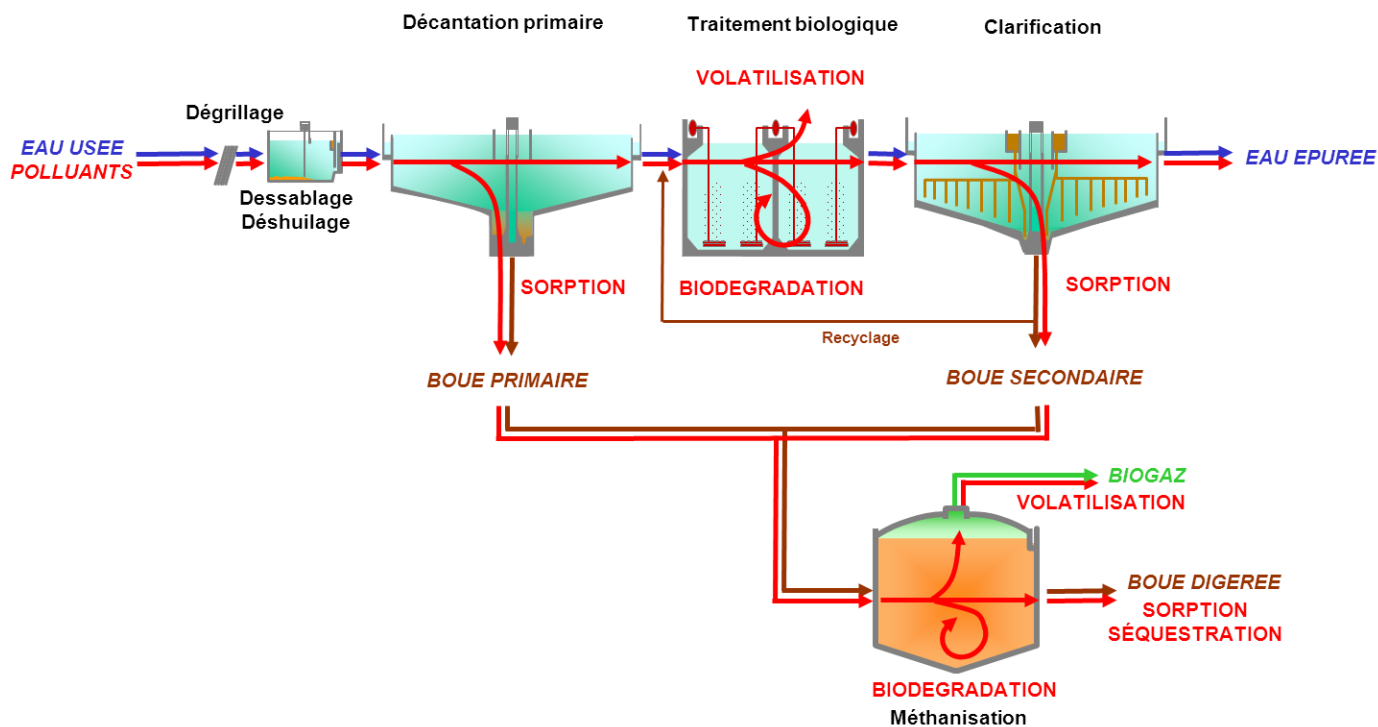


Figure I-11: Devenir des micropolluants dans la filière d'épuration

Des études révèlent de forts abattements en HAP et PCB pour la filière eau : par exemple entre 77 et 89% (Tian et al., 2012) pour les HAP, 75% pour les PCB et respectivement 76 et 98% pour les PCB et HAP (Blanchard et al., 2004). Ces abattements sont variables suivant la molécule étudiée et seuls les phénomènes de biodégradation peuvent être considérés comme mécanismes d'élimination. Les phénomènes de sorption et de volatilisation ne représentent qu'un transfert de la pollution d'une phase à une autre. Les phénomènes de sorption ont été majoritairement décrits comme étant ceux permettant, au sein des stations d'épuration, l'abattement des HAP et PCB de la phase eau. Dus aux propriétés hydrophobes de ses substances, ils s'opèrent au détriment de la phase boue ainsi contaminée. Ainsi la majorité des flux entrant de HAP et PCB se retrouve dans la phase boue. La concentration en HAP et PCB dans les boues varie selon le système étudié, les caractéristiques de l'eau usée, le type de boue. Les tableaux I-7 et I-8 présentent les valeurs en HAP et PCB respectivement trouvées récemment dans la littérature. Selon la molécule étudiée, les concentrations dans les boues peuvent varier entre $0.001 \text{ mg}_{\text{HAP}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ à plus de $10 \text{ mg}_{\text{HAP}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ et entre $0,1 \text{ } \mu\text{g}_{\text{PCB}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ et environ $2 \text{ mg}_{\text{PCB}}/\text{kg}_{\text{MS}}$.

Tableau I-7: Concentration en HAP mesurée dans différentes boues de STEP (mg/kg_{MS})

	(Cai et al., 2007) Chine	(Villar et al., 2009) Espagne	(Mansuy-Huault et al., 2009) France	(Salihoglu et al. 2010) Turquie	(Zeng et al., 2010) Chine	(Khadhar et al., 2010) Tunisie	(Zhai et al., 2011) Chine
Nb échantillon	1	1	8	1	nr	3	nr
Nb prélèvement	durant 1 an	≥12	1	5	1	nr	nr
Nb STEP	11	1	3	14	3	9	4
Fluorène	0,08 - 2,7	0,18	0,2 - 1,0	na	0,04 - 0,69	(<0,03µg/kg) - 0,37	0,23 - 0,37
Phénanthrène	0,05 - 6,6	0,31	0,7 - 4,8	0 - 1,66	0,54 - 2,25	0,009 - 2,91	0,18 - 1,44
Anthracène	0,07 - 6,1	0,03	0,2 - 0,9	0 - 0,37	0,06 - 0,46	(<0,06µg/kg) - 0,007	<0,001 - 0,50
Fluoranthène	<0,001 - 8,0	0,17	0,8 - 10,4	0,012 - 0,88	0,30 - 1,30	0,009 - 0,85	0,23 - 0,49
Pyrène	0,08 - 4,3	1,09	1,9 - 8,2	0,01 - 1,73	0,57 - 1,19	0,016 - 1,35	0,24 - 0,83
BaA	<0,001 - 8,3	0,23	0,6 - 4,2	0,15 - 1,46	0,13 - 0,18	(<0,08µg/kg) - 0,24	<0,003 - 0,50
Chrysène	<0,001 - 4,0	0,30	0,6 - 6,1	0,1 - 0,93	0,01 - 0,30	0,005 - 0,78	0,05 - 0,73
BbF	<0,001 - 2,9	0,24	3,3 - 13,1	0,22 - 2,04	0,06 - 0,31	(<0,04µg/kg) - 0,21	0,06 - 0,42
BkF	0,007 - 7,0	0,01	1,2 - 4,5	0,22 - 1,76	0,05 - 0,21	<0,0005 - 0,001	0,04 - 0,25
BaP	0,007 - 6,6	0,09	1,7 - 5,8	0,22 - 2,47	0,01 - 0,02	(<0,08µg/kg) - 0,14	<0,007 - 0,30
DBA	<0,001 - 0,2	0,11	0,4 - 1,6	0 - 1,61	0,003 - 0,32	(<0,05µg/kg)	<0,004
BghiP	<0,001 - 0,6	0,47	1,9 - 6,2	0,31 - 2,72	0,03 - 0,17	(<0,02µg/kg)	<0,003 - 0,23
Indeno	<0,001 - 0,5	0,04	2,1 - 7,2	0,31 - 2,91	0,06 - 0,31	(<0,08µg/kg)	<0,005 - 1,76
Total des 16 HAP prioritaires	0,08 - 16	4,18	16,8-72,6	1,48 - 17,31	>2,49 - >6,83	0,1 - 7,7	1,97 - 6,58

Valeur minimale et maximale, nm : non mesuré, nr : non renseigné

Tableau I-8: Concentration en PCB mesurée dans différentes boues de STEP (mg/kg_{MS})

Valeur minimale et maximale, nm : non mesuré,

	(de Souza Pereira and Kuch, 2005) Brésil	(Guo et al., 2009) Chine	(Ju et al., 2009) Corée	(Roig et al., 2012) Espagne
Nb boues / Nb prélèvement	2 / 1	8 / 1	6 / 1	1 / 5
PCB 28	<0,0005 - 0,004	0,005 - 0,01	nm	0,01 - 0,02
PCB 52	<0,0005 - 0,008	0,001 - 0,005	nm	0,01 - 0,02
PCB 101	0,001 - 0,004	0,0004 - 0,001	nm	0,01 - 0,02
PCB 118	nm	0,0004 - 0,001	nd - 0,007	<0,01
PCB 138	0,001 - 0,002	0,0005 - 0,001	nm	0,01 - 0,02
PCB 153	0,004 - 0,008	0,0004 - 0,001	nm	0,01 - 0,3
PCB 180	0,004 - 0,004	0,0001 - 0,0002	0,02 - 0,005	0,01 - 0,46
ΣPCB mesurés	0,004 - 0,01	0,068 - 0,157	0,07 - 0,138	0,14 - 1,74

Le nonylphénol est un cas particulier parmi les micropolluants organiques. En effet sa présence a été rapportée dans de nombreux affluents de station d'épuration (Mao et al., 2012) mais il peut aussi être formé au sein de ces systèmes à partir des nonylphénols éthoxylates présents dans les affluents. Les nonylphénols polyéthoxylates sont biodégradés au sein des stations d'épuration et forme des métabolites bioréfractaires parmi lesquels on retrouve le nonylphénol (NP), les nonylphénols mono et di-éthoxylés (NP1EO et NP2EO) et les nonylphénols éthoxycarboxylés (NPEC).

Certaines études ont montré une capacité d'abattement des nonylphénols le long de la filière eau, entre 75 et 97% pour le NP (Céspedes et al., 2008) et entre 73 et 79% (Höhne et Püttmann, 2008) pour une solution commerciale de 4-nonylphenol. Selon les systèmes épuratoires mis en place, ces composés peuvent aussi être plus concentrés dans les eaux traitées que dans les eaux usées (Nakada et al., 2006; Céspedes et al., 2008). Comme dans le cas des HAP et des PCB, les phénomènes de sorption sont responsables de l'accumulation de NP dans la filière boue (de l'ordre de la centaine de mg/kg_{MS}) (Tableau I-9).

Tableau I-9: Concentration en NP dans des boues secondaires de STEP en mg/kg_{MS}

	(Ghanem et al., 2007)	(Céspedes et al., 2008)	(Aparicio et al., 2007)	(González et al., 2010)
Nb boues/ Nb prélèvement	3/12	5/1	4/2	12/2 à 12
Nonylphénol	16,5 - 216,5	20 - 194	12 - 144	<0.019 - 194

Outre leur rôle de lieu de convergence des micropolluants, les STEP sont donc aussi un lieu de transfert et de dissémination de la pollution.

Seuls les phénomènes de biodégradation représentent donc une véritable élimination de la pollution au sein de la station. Ils peuvent avoir lieu soit au sein du bassin de traitement biologique soit lors des procédés de stabilisation des boues.

Différents procédés permettent de stabiliser les boues de STEP, c'est-à-dire de diminuer leur pouvoir fermentescible (pour réduire les nuisances olfactives) et leur volume. La digestion anaérobie est l'un de ces procédés et conduit à la réduction de la matière organique en eau, CO₂ et CH₄. Cette méthode de stabilisation a révélé un potentiel de dégradation des HAP, PCB et NP (Barret et al. 2010a).

Le procédé de digestion anaérobie a été choisi comme procédé modèle pour notre étude. Le paragraphe suivant en explique le principe.

I.2.3. La digestion anaérobie

I.2.3.1. Principe général

La digestion anaérobie consiste en une fermentation de matières organiques sous conditions anaérobies strictes. Ce processus fait appel à une flore microbienne très diverse pour transformer la matière organique en biogaz. Le méthane ainsi produit peut ensuite être récupéré, stocké et valorisé comme source de chaleur ou d'électricité lors de sa combustion. L'énergie produite peut être utilisée dans le fonctionnement même des stations

I.2.3.2. Les étapes de la digestion anaérobie et ses acteurs

La digestion anaérobie se décompose en quatre grandes phases qui font chacune intervenir des microorganismes (Figure I-12) : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse (Moletta, 2008).

L'hydrolyse

Cette étape permet l'hydrolyse de molécules de haut poids moléculaire de type polysaccharide, lipide, protéine ou acide nucléique, en monomères comme le glucose, les acides gras, les acides aminés et les bases azotées. C'est une étape en général lente comparée à l'étape suivante d'acidogénèse qui est 30 à 40 fois plus rapide.

Les bactéries impliquées dans cette étape forment un ensemble phylogénétiquement hétérogène. Elles ont un métabolisme anaérobie strict ou facultatif et sont mésophiles ou thermophiles.

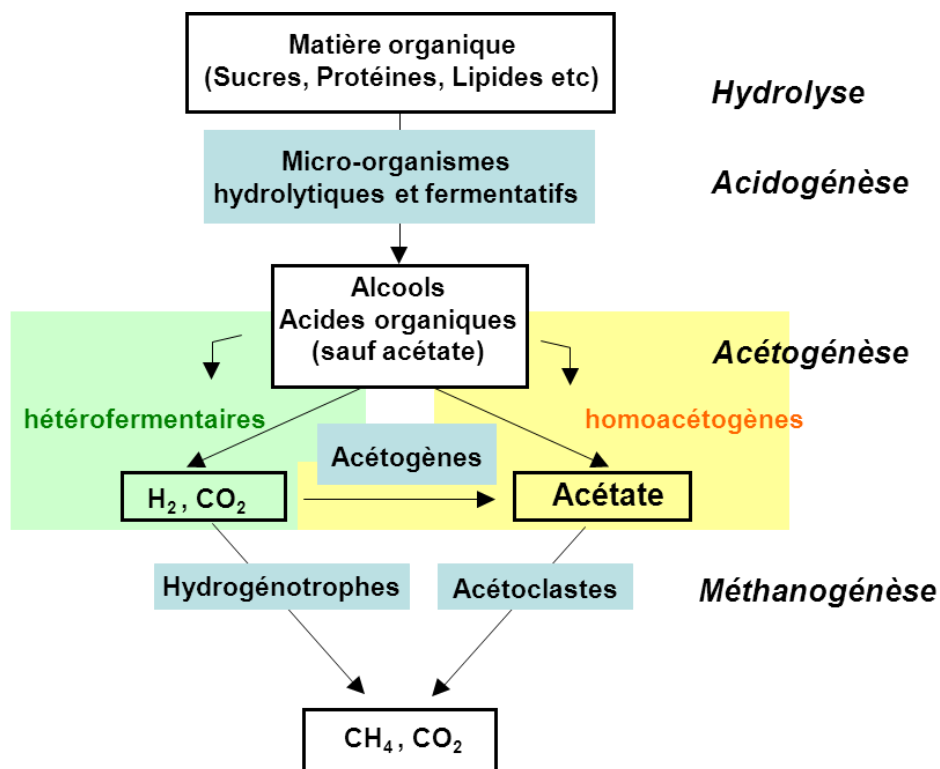


Figure I-12: Les étapes de la digestion anaérobie.

L'acidogénèse

L'étape d'acidogénèse transforme les monomères issus de l'étape précédente en acides gras volatils, en alcool, en acides organiques, en hydrogène et dioxyde de carbone.

La fraction la plus importante des bactéries acidogènes est constituée des bactéries anaérobies strictes du genre *Clostridium*. Les genres bactériens *Bactéroides*, *Bacillus*, *Pelobacter*, *Acetobacterium* et *Ulyobacter* ainsi que la famille des *Enterobacteriaceae* sont aussi souvent présents. Cette étape est celle où l'on enregistre la vitesse de réaction la

plus élevée. En cas de surcharge organique, il peut y avoir une accumulation d'intermédiaires comme l'hydrogène et l'acétate qui peuvent avoir une action inhibitrice sur les microorganismes des deux étapes suivantes et entraîner l'arrêt de la digestion anaérobie.

L'acétogénèse

L'acétogénèse permet la transformation des produits de l'acidogénèse en précurseurs directs du méthane : l'acétate, l'hydrogène et le CO₂. Deux voies de transformation sont possibles : une voie hétérofermentaire et une autre homoacétogène.

La voie hétérofermentaire conduit à la production d'hydrogène, de CO₂ et d'autres acides comme le pyruvate, le butyrate et le propionate. Les bactéries de cette voie sont des bactéries productrices obligées d'hydrogène. Ce sont des bactéries syntrophiques. Leur croissance dépend de la présence de bactéries qui consomment immédiatement l'hydrogène car la réaction catalysée par ces bactéries possède un ΔG° positif. Elles peuvent appartenir aux genres *Syntrophomonas*, *Synthrophobacter*, *Synthrophus*, *Synthrophococcus* et *Synthrophospora* qui ont un temps de doublement assez long.

La voie homoacétogène produit exclusivement de l'acétate. Les bactéries responsables de cette étape peuvent être divisées en deux groupes suivant l'origine de l'acétate : substrat carboné (Groupe 1) ou réduction du CO₂ par H₂ (Groupe 2). Ainsi dans le groupe 1 on trouve les genres *Butyribacterium* et *Peptococcus* alors que dans le groupe 2, on retrouve majoritairement les genres *Acetobacterium*, *Clostridium* et *Sporomusa*.

La méthanogénèse

L'étape de méthanogénèse est la dernière de la digestion anaérobie. Lors de cette étape les produits de l'acétogénèse sont transformés en méthane selon deux types de réactions : la transformation de dioxyde de carbone et de l'hydrogène et celle de l'acétate et de l'hydrogène. Les microorganismes responsables de la conversion de ces produits en méthane appartiennent au domaine des *Archaea*. Ils ont un temps de doublement compris entre 3-4h et 7 jours. Deux catégories d'archées produisent classiquement le méthane des digesteurs :

Les archées méthanogènes hydrogénotrophes ou hydrogénophiles dont les genres les plus représentés sont *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanogenium* et *Methanocorpusculum*

Les archées méthanogènes acétoclastes dont les genres les plus fréquents dans les digesteurs sont *Methanosarcina* et *Methanosaeta*.

Cette étape de digestion anaérobie qui permet la stabilisation des boues de STEP peut potentiellement agir sur le devenir des micropolluants organiques qui se sont sorbés sur

la boue au cours du traitement de l'eau. Le chapitre suivant fait état des données récentes sur la dégradation des HAP, PCB et NP sous condition anaérobie. Un premier sous chapitre rappelle brièvement l'état des connaissances sur la dégradation de ces molécules sous condition aérobie.

I.3. La dégradation des micropolluants organiques

I.3.1. En condition aérobie

I.3.1.1. Les molécules mono-aromatiques

Concernant les molécules mono-aromatiques, bon nombre d'études ont d'abord porté sur la dégradation des BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylène). De nombreuses bactéries (majoritairement du genre *Pseudomonas*) ont été caractérisées comme pouvant utiliser les BTEX comme seule source de carbone (Jindrová et al., 2002). L'étape initiale de dégradation d'une molécule BTEX en présence d'oxygène est réalisée soit par une oxydation directe du cycle aromatique via une mono ou dioxygénase, soit par l'oxydation de la chaîne alkyle latérale catalysée par une mono-oxygénase.

La biodégradation du nonyphénol (NP) a été rapportée dans des échantillons d'eau, de sédiment, de sol ou de boue (Soares et al., 2008). Plusieurs espèces du genre *Sphingomonas* et *Pseudomonas* ont été isolées d'écosystèmes dégradant le NP (Corvini et al., 2006). Suivant l'isomère étudié, les bactéries utilisent le NP soit comme seule source de carbone ou soit via un processus de co-métabolisme (Kohler, et al. 2008).

Sous condition aérobie, les études portant sur les mécanismes moléculaires de dégradation du NP ont mis récemment en évidence deux voies métaboliques différentes possibles: la voie de clivage du noyau phénolique et la voie de dégradation du groupe « nonyl » lipophile linéaire.

La première étape de la voie du clivage du noyau aromatique est une monohydroxylation en position ortho par une hydroxylase. Elle est ensuite suivie de l'ouverture du cycle soit en position ortho par la catéchol 1,2-dioxygénase (C12O) soit en position méta par la catéchol 2,3-dioxygénase (C23O) (Figure I-13). Tuan et al. (2011) ont dessiné différentes amorces capables de détecter la présence des gènes codant pour les différentes enzymes qui catabolisent cette voie. Ils ont alors démontré que plusieurs souches de *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, une souche de *Shinella* et une *Méthylbacterium* pouvaient être impliquées dans la dégradation d'alkylphénol à longue chaîne.

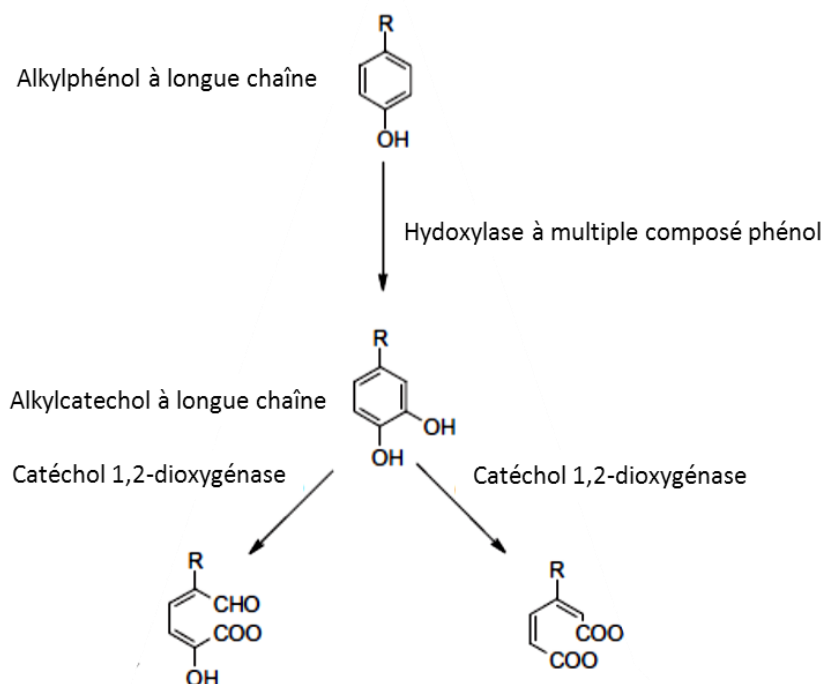


Figure I-13: Voie métabolique proposée d'ouverture du cycle aromatique du NP (Tuan et al., 2011)

Parmi les bactéries isolées capables de dégrader le NP en condition aérobie, les bactéries appartenant à l'ordre des *Sphingomonades* (regroupant des genres *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, et *Sphingopyxis*) représentent celles qui ont la plus forte capacité de dégradation et elles utilisent le NP comme seule source de carbone (Corvini et al., 2006). La voie de dégradation du NP impliquant l'élimination de la chaîne linéaire d'alcane du NP est décrite chez des souches de *Sphingomonas* et *Sphingobium*. Il s'agit d'une hydroxylation en position ipso d'un isomère de NP (Kohler, et al. 2008; Corvini et al. 2006) (Figure I-14). Cette nouvelle voie de dégradation est proposée pour la première fois par (Gabriel et al., 2005) qui étudient les intermédiaires métaboliques produits lors de la dégradation d'un isomère du 4-NP, le 4-NP₁₁₂ et de la dégradation co-métabolique de deux autres isomères, le 4-NP₂ et 4-NP₁ par une culture de *Sphingomonas xenophaga* Bayram.

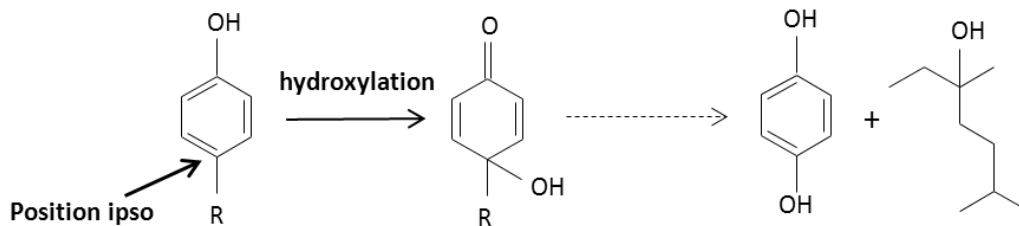


Figure I-14: Voie métabolique possible de dégradation aérobie du NP par élimination de la chaîne linéaire (Kohler, et al. 2008)

1.3.1.2. Les molécules poly-aromatiques

1.3.1.2.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

La dégradation des HAP en condition aérobie est un processus très étudié et les rendements enregistrés sont plus forts qu'en absence d'oxygène. En présence d'oxygène, tout comme pour les BTEX, la dégradation des HAP est initiée par l'ouverture du cycle aromatique grâce à l'incorporation d'oxygène. La dégradation de ces molécules par des bactéries se fait principalement sous l'action d'enzyme HAP-dioxygénase (Cerniglia 1992). Les gènes qui codent pour le complexe dioxygénase (formé de trois sous-unités : une NADPH-ferrodoxine réductase, une ferrodoxine et une oxygénase) sont distingués en deux catégories ; les gènes *nah-like* provenant principalement des espèces *Pseudomonas* et les gènes (*phd*, *nag*, *phn*, *nar*) portés par d'autres bactéries (Lu et al., 2011). Ces gènes sont portés soit par le chromosome bactérien, soit par des plasmides. Des transferts horizontaux de gènes, d'une bactérie à l'autre, sont alors possibles sous l'effet d'une pression de sélection environnementale. De nombreuses amorces ont été dessinées et permettent l'étude de la diversité des populations bactériennes HAP-dégradantes (Cébron et al., 2008). De nombreuses bactéries, pouvant utiliser les HAP comme source de carbone et d'énergie en présence d'oxygène, ont été isolées, principalement à partir de sols et de sédiments. Elles appartiennent à de nombreux genres bactériens comme *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus* ...

La dégradation des HAP est majoritairement étudiée dans des cas d'hyper-contamination de sols ou de sédiments. Peu d'études ont été réalisées dans des écosystèmes faiblement contaminés comme peuvent l'être les boues de STEP. Pourtant la capacité de ces systèmes à dégrader les HAP présents en faible concentration a été démontrée (Trably et Patureau 2006).

1.3.1.2.2. Les polychlorobiphényles

La biodégradation des PCB en condition aérobie (mais aussi anoxique) est fortement dépendante du nombre d'atome de chlore que présente la molécule et de leurs positions.

Les bactéries aérobies PCB-dégradantes appartiennent à des genres très différents comme *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Acidovorax*, *Rhodococcus* (Pieper et Seeger, 2008). L'analyse des bactéries capables de dégrader le biphényle a révélé leur capacité à dégrader les PCB. En général, les PCB les moins chlorés sont ceux les mieux dégrader en condition aérobie. Cependant la bactérie *Burkholderia xenovorans LB400* fait figure d'exception et est capable de dégrader en condition oxiqye le 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphényle (Bopp, 1986). La dégradation des PCB est effectuée par l'intermédiaire des enzymes de la voie métabolique dite supérieure du biphényle représentée en Figure I-15.

Les souches *Burkholderia xenovorans LB400* et *Rhodococcus RHA1* sont deux microorganismes modèles qui ont été beaucoup étudiés en raison de leur capacité à métaboliser un large panel de PCB. Leurs génomes ont été séquencés et révèlent que les gènes *bph* codant pour les enzymes de la voie du même nom, sont placés sur des éléments acquis et mobiles (Chain et al., 2006; McLeod et al., 2006).

1.3.2. En conditions anoxiques

Dans les milieux dépourvus d'oxygène, il existe de nombreux autres accepteurs d'électrons possibles comme les nitrates, les sulfates, ou encore le CO₂. La dégradation des polluants mono- et poly-aromatiques en condition anoxique peut donc être étudiée sous différentes conditions dont les principales étudiées sont les conditions dénitrifiantes, sulfato-réductrices, et plus rarement méthanogènes.

1.3.2.1. Les molécules mono-aromatiques

Comme en condition aérobie, la dégradation des molécules mono-aromatiques de types BTEX a aussi été beaucoup étudiée (Weelink et al. 2010; Vogt et al. 2011). Par exemple, la dégradation du benzène a été observée en condition sulfato-réductrice, dénitrifiante et méthanogène (Weelink et al., 2010). Elle repose sur trois voies de dégradation distinctes: hydroxylation, méthylation suivie de l'addition de fumarate ou carboxylation (Figure I-16). Le toluène a été identifié comme intermédiaire métabolique du benzène et suggère une étape de méthylation. Le phénol a lui aussi été identifié comme intermédiaire métabolique suggérant ainsi une hydroxylation. Enfin le benzoate est le troisième métabolite identifié lors de la dégradation du benzène suggérant quant à lui une étape de carboxylation.

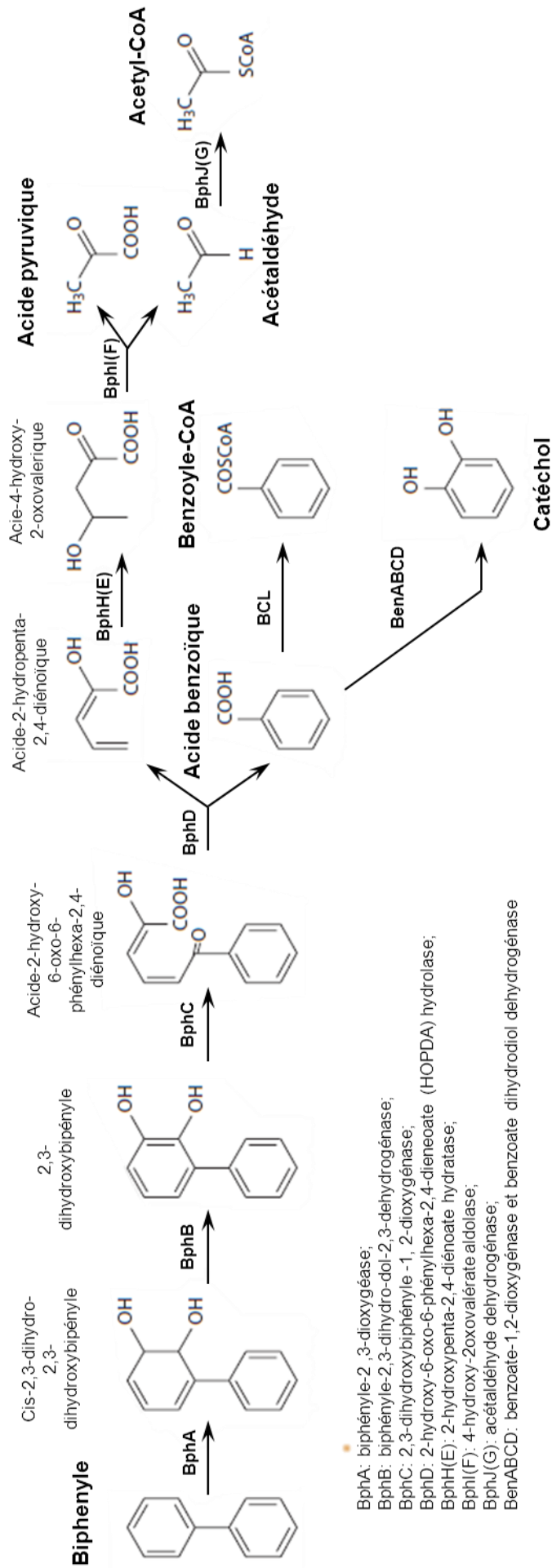


Figure I-15: Voie métabolique de dégradation du biphenyle d'après Pieper & Seeger (2008)

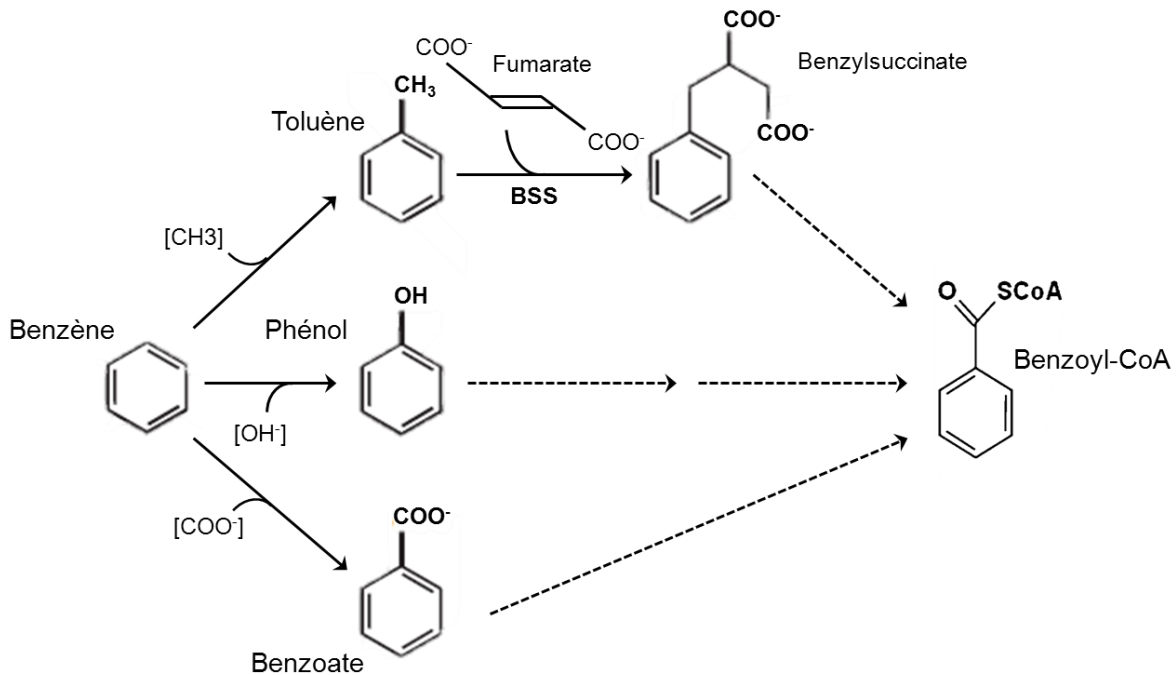


Figure I-16: Voies possibles de dégradation du benzène d'après Vogt et al. (2011)

Ces différentes voies convergent vers la formation de benzoyl-CoA, intermédiaire central dans la dégradation des molécules aromatiques. Une fois formée, la molécule de benzoyl-CoA peut être dégradée en acétyl-CoA, intervenant dans le cycle de Krebs (Figure I-17). L'addition du fumarate lors de la dégradation du toluène ou du benzène (via la formation de toluène), est catalysée par la benzylsuccinate synthase (BSS). Cette enzyme est aussi impliquée dans la dégradation du xylène. Le gène *bssA* codant pour la sous unité α de la benzylsuccinate synthase est utilisé comme indicateur de dégradation des molécules mono-aromatiques de types BTEX (Washer et Edwards, 2007; Winderl et al., 2007). Le gène *bamA* intervenant dans la transformation du benzoyl-CoA en acétyl-CoA a lui aussi été récemment utilisé pour détecter les microorganismes dégradant ces composés dans des enrichissements sulfato-réducteurs (Kuntze et al., 2008) puis dénitrifiants (Li et al. 2012).

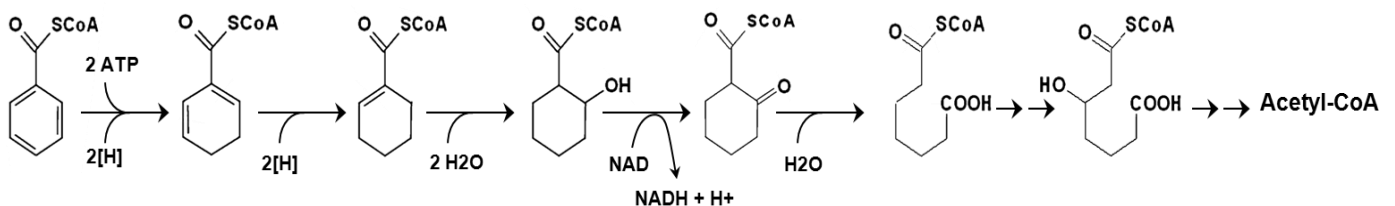


Figure I-17: Voie possible de dégradation du benzoyl-CoA en acétyl CoA d'après Gibson & Harwood (2002) en condition anoxique

La dégradation du nonylphénol et notamment de son isomère 4-n-nonyphenol a été rapportée en condition dénitrifiante par plusieurs auteurs (Chang et al. 2007; De Weert et al. 2011). Sous ces conditions, la dégradation du nonylphénol dépendrait de la forme de l'isomère étudié (De Weert et al., 2011). Dans une étude sur des sédiments pollués par le nonylphénol, De Weert et al, montre d'une part, la capacité de ce sédiment à dégrader le 4-n-nonylphénol (isomère à chaîne linéaire) et d'autre part l'absence de dégradation d'isomère branché (tNP). Ils suggèrent ainsi qu'en condition dénitrifiante, la dégradation du 4-n-nonylphénol débiterait par la dégradation de la chaîne linéaire alkyle et non par le noyau phénol. Les souches identifiées dans ces sédiments présentent de fortes similarités génétiques avec des bactéries dénitrifiantes non isolées et deux souches dénitrifiantes connues pour dégrader des alcanes (*Parvibaculum lavamentivorans* DS-1 connues pour convertir les LAS en sulfophénylcarboxylate et *Pseudomonas stutzeri* et *Pseudomonas aeruginosa* capables de dégrader le phénol et les alcanes).

Chang et al. (2005) ont isolé 8 souches bactériennes provenant de boue de station d'épuration, capables de dégrader le NP en condition dénitrifiante (mais aussi sulfato-réductrice et méthanogène). L'utilisation du NP comme seule source de carbone par ces 8 souches est remise en cause par Corvini et al. (2006) mais il n'en reste pas moins que deux isolats, montrant les plus forts taux de dégradation de NP en condition anoxique ont été identifiés comme étant un *Bacillus cereus* et un *Acinetobacter baumannii* (Chang et al. 2005).

La dégradation du NP en condition sulfato-réductrice est très peu documentée, seuls les travaux de Chang et al (2004; 2005) en ont montré la possibilité. Chang et al. (2005) ont travaillé sur des enrichissements de population dégradant les NP à partir de boues de station d'épuration dopées à des concentrations en NP de 1g/kg_{MS} (soit 10 à 100 fois plus que les teneurs classiques des boues, cf. Tableau I-9). Les bactéries isolées par ces auteurs, ont montré des capacités de dégradation du NP plus forte que dans les autres conditions anoxiques (dégradation en condition sulfato-réductrice > dégradation en condition méthanogène > dégradation en condition dénitrifiante).

La dégradation du NP sous condition méthanogène a été rapportée par plusieurs auteurs (Trably et al. 2005; Chang et al. 2005; Patureau et al. 2008a). Cette capacité de dégradation diffère fortement d'une étude à l'autre. En effet, dans des études en batch de 20 et 80 jours, Chang et al. (2007) à partir d'enrichissement de sol dopé à des concentrations en NP de 50 mg/kg, rapportent des abattements de 40% et 100%. En réacteur continu, sur des boues urbaine de STEP faiblement dopée, avec un temps de séjour de 20 jours, Patureau et al. (2008a) montrent une dégradation du NP (abattement 25%) alors qu'Hernandez-Raquet et al. (2007) n'observent aucune dégradation sur des boues activée de STEP dopée à 264 mg/kg_{MS}. Des enrichissements de microorganismes

dégradants le NP à partir de boue de STEP ont permis d'identifier plusieurs consortia impliqués dans la dégradation de cette molécule (Trably et al. 2005) mais aucune souche n'a été à ce jour isolée sous condition méthanogène.

1.3.2.2. Les molécules poly-aromatiques

La dégradation des HAP en condition dénitrifiante a été mise en évidence dans plusieurs écosystèmes dont les boues. Souvent comparés aux conditions sulfato-réductrices, les abattements en HAP en conditions dénitrifiantes varient suivant le système étudié. Lu et al. (2012) enregistrent pour des sédiments contaminés des abattements de 77% pour des HAP de 2 à 3 cycles, et de 55% pour des HAP de 4 cycles (abattements supérieurs à ceux calculés en condition sulfato-réductrice). Chang et al. (2003) quant à eux observent une inhibition de la dégradation des HAP en condition dénitrifiante par rapport aux conditions sulfato-réductrices et méthanogènes. Des études en culture pure ont permis d'isoler et d'identifier des acteurs de la dégradation des HAP en condition dénitrifiante. Rockne et al. (2000) ont isolé à partir d'un consortium enrichi en microorganismes dénitrifiants provenant d'un réacteur à lit fluidifié, trois cultures capables d'utiliser le naphthalène comme seule source de carbone avec le nitrate comme accepteur d'électrons. Dans cette même étude, des analyses phylogénétiques ont révélé que ces cultures étaient proches des espèces dénitrifiantes *Pseudomonas stutzeri* et *Vibrio pelagius*.

En condition sulfato-réductrice, différentes cultures de bactéries ont révélé une capacité à dégrader les HAP. Musat et al. (2009) ont démontré la capacité de deux cultures bactériennes sulfato-réductrices obtenues par enrichissement à partir de sédiment, à dégrader le naphthalène. Ces cultures appartiennent à la classe des *Deltaproteobacteria* et leurs séquences possèdent des similitudes fortes (99,8%) avec les bactéries de la famille des *Desulfobacteracea*. Par ailleurs, Davidova et al. (2007) ont obtenu des enrichissements bactériens capables de dégrader le phénanthrène à partir d'écosystèmes sédimentaires marins. Ces enrichissements contenaient des *Deltaproteobacteria*.

Depuis quelques années, des études ont démontré la capacité de dégrader les HAP en condition méthanogène (Chang et al. 2003; Trably et al. 2003; Chang et al. 2006; Barret, et al. 2010a). Les performances mesurées en batch et en continu sont variables : en continu elles sont très fortement corrélées à l'élimination des matières organiques au cours de la méthanisation. Les acteurs de cette dégradation sont encore peu connus mais quelques isola ont été identifiés comme HAP-dégradant. Zhang et al. (2012), par des études isotopiques, ont identifié des bactéries responsables de la dégradation de l'anthracène en condition méthanogène. A partir d'études en microcosmes menées sur des sédiments provenant d'un site contaminé, dopés à des concentrations de 40 mg/kg_{MS}, ils ont identifié trois phylotypes principaux appartenant tous au phylum

des *Proteobacteria* : *Methylibium*, *Legionella* et *Rhizobiales*. Par ailleurs, des données de pyroséquençage obtenues à partir de culture d'enrichissement de consortia bactériens méthanogènes dégradant le pétrole, suggèrent l'importance des genres *Clostridium*, *Methanosaeta*, *Methanoculleus*, dans la dégradation de deux HAP méthylés à 2 cycles en condition méthanogène (Berdugo-Clavijo et al., 2012).

Les mécanismes de dégradation des HAP, en conditions anoxiques restent peu connus mais plusieurs études ont proposé des voies métaboliques de dégradation du naphthalène ou du phénanthrène en condition sulfato-réductrice.

En utilisant le carbone ¹³C marqué, Zhang et al. (2000) ont démontré l'activation du naphthalène en acide naphthoïque par incorporation de CO₂. Ces résultats ont été confirmés plus tard par Meckenstock et al. (2000) dans une étude portant sur une culture sulfato-réductrice enrichie à partir d'un sol d'un aquifère contaminé. La méthylation représente une autre voie possible de dégradation du naphthalène avec la formation de méthyl-naphthalène qui est ensuite oxydé en acide naphthoïque. De fait, les études portant sur la dégradation du naphthalène et du 2-méthyl naphthalène (Annweiler et al., 2000; Musat et al., 2009) permettent de proposer les voies de dégradation représentées sur la Figure I-18. L'addition d'un fumarate sur le 2-méthyl-naphthalène entraîne la formation d'acide naphthyl-2-méthyl-succinyle, réaction analogue à l'addition de fumarate sur le toluène formant ainsi du benzylsuccinate.

Certains métabolites de dégradation du phénanthrène en condition sulfato-réductrice ont, eux aussi, pu être mis en évidence. La présence, d'acide phénanthrène-2-carboxylique retrouvé par Davidova et al. (2007) suppose une dégradation de ce composé selon une voie analogue à celle du naphthalène par une carboxylation directe du phénanthrène. Par ailleurs, Tsai et al. (2009), en étudiant la dégradation du phénanthrène en réacteur batch (à des concentrations en phénanthrène de 5mg/L) par un consortium bactérien sulfato-réducteur provenant d'une boue dépuration porcine, ont détecté le p-crésol et le phénol comme métabolites. Ces résultats suggèrent, de fait, une dégradation décrite dans la Figure I-19.

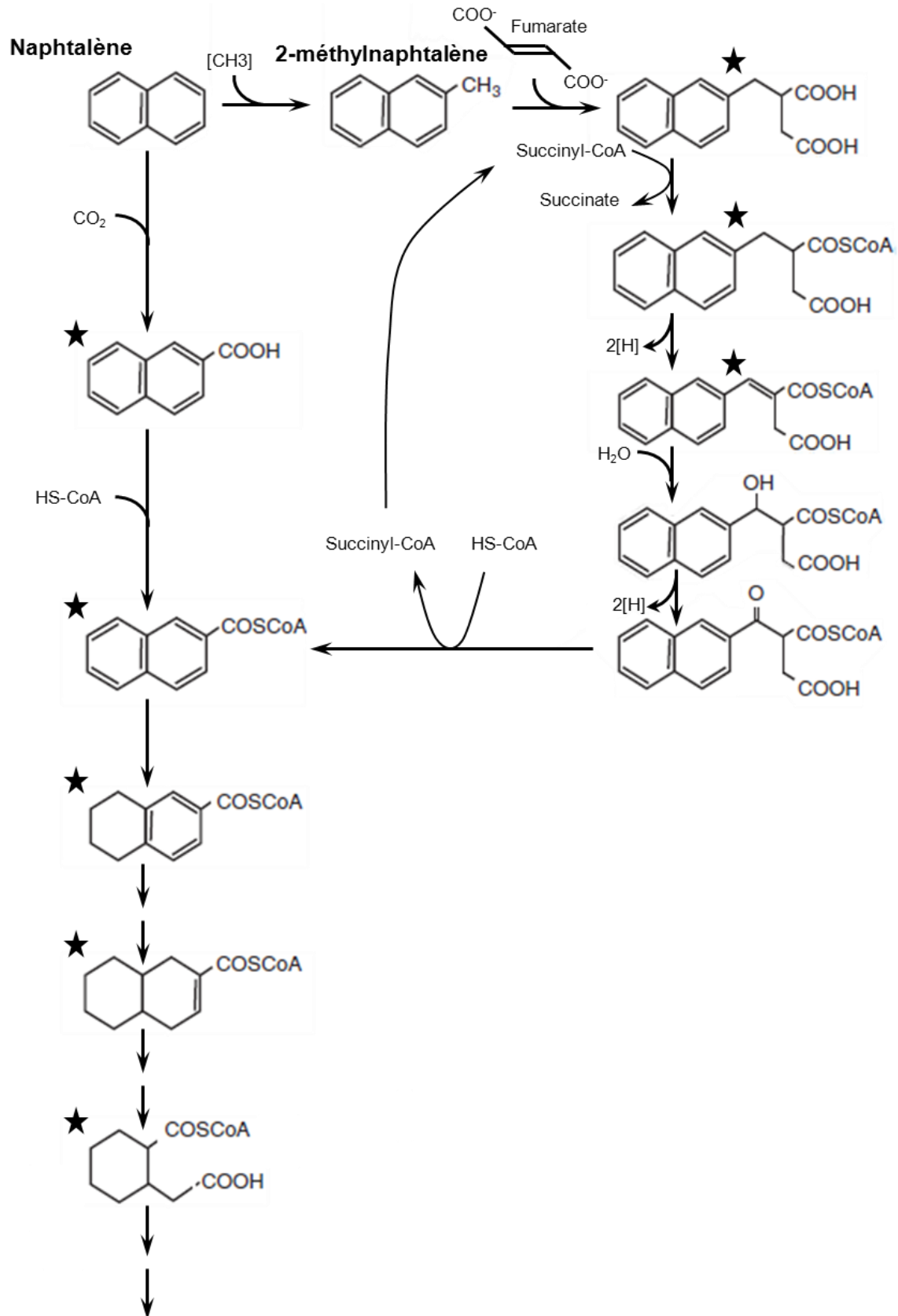


Figure I-18: Voies possibles de dégradation du naphthalène et du 2-méthylnaphthalène d'après Meckenstock & Mouttaki (2011) en condition sulfato-réductrice

★ Métabolites détectés

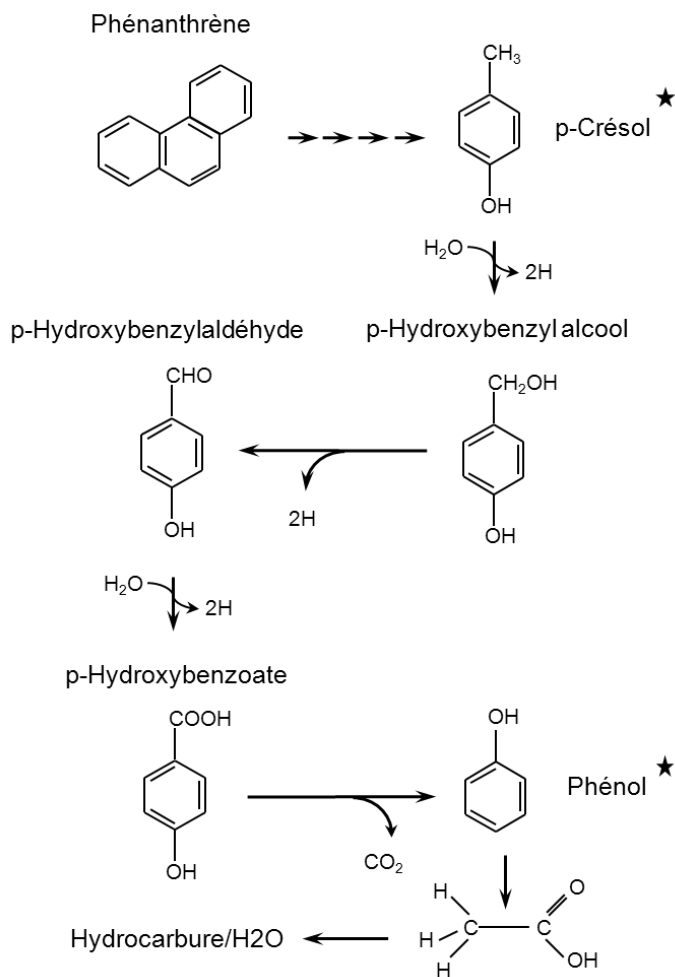


Figure I-19: Voie possible de dégradation du phénanthrène en condition sulfato-réductrice d'après Tsai et al. (2009)

★ Métabolites détectés

La dégradation des PCB, en condition anoxique, a été beaucoup étudiée à partir de sols et sédiments contaminés mais la dégradation de ces molécules dans des boues urbaines, en condition méthanogène a aussi été observée (Patureau & E Trably 2006; Benabdallah El-Hadj et al. 2007; Barret et al. 2010a; Bertin et al. 2011) .

En condition méthanogène, les rendements de dégradation des PCB varient suivant les paramètres opératoires et le degré de chloration des molécules. Patureau et Trably (2006), dans une étude en réacteur continu mésophile à des concentrations en PCB autour de 2 mg/kg_{MS} suggèrent une meilleure dégradation des composés les plus chlorés. Benabdallah El-Hadj et al. (2007) dans son étude en réacteur continu à des concentrations totale en PCB entre 1,5 et 3 mg/kg_{MS}, confirment ces résultats et enregistrent des abattements en PCB plus importants en condition thermophile (55°C) que mésophile (35°C). Dans une étude en réacteur batch de 10 jours, Bertin et al. (2011) enregistrent des abattements de plus de 50% pour les PCB pourvus de 6 à 9 chlores alors que les PCB pourvus de 10 chlores s'accroissent. Une étude des communautés microbiennes révèle des populations différentes suivant la température (35°C ou 55°C)

et les abattements enregistrés en condition thermophile sont là aussi meilleurs qu'en condition mésophile. A 35°C, la communauté est constituée majoritairement de *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, d'*Acidobacter* et de *Firmicutes* du genre *Clostridium* ainsi que de trois phylotypes différents d'archées. De plus, les abattements plus faibles en PCB enregistrés sur les microcosmes contenant du bromoethanesulfonate (BES) (composé inhibant l'activité méthanogène) indiquent que les populations méthanogènes peuvent jouer un rôle dans la dégradation des PCB. Ces résultats sont à discuter car le caractère spécifique de cet inhibiteur peut être remis en doute. En effet, Ye et al. (1999) soulignent que le BES peut aussi inhiber des populations non méthanogènes qui seraient capables de déchloration réductrice sur les PCB. Selon les mêmes auteurs, cet inhibiteur peut aussi rentrer en compétition avec les PCB en jouant le rôle d'accepteur final d'électrons. Une étude sur des populations microbiennes, provenant de sédiments marins contaminés, vient elle aussi ébranler l'hypothèse de Bertin et al (2011), quant à l'implication directe des populations méthanogènes dans la dégradation des PCB (Zanaroli et al., 2012). En effet, dans cette étude en microcosmes, l'ajout de dihydrogène et de petits acides gras dans le but initial de soutenir l'activité de déchloration des PCB, entraîne simultanément une diminution des taux de déchloration en PCB et une stimulation des activités sulfato-réductrice et méthanogène des microcosmes. Les auteurs suggèrent ainsi que, ni les microorganismes sulfato-réducteurs, ni les méthanogènes, ne sont directement impliqués dans la dégradation des PCB.

La dégradation des PCB en condition anaérobie est le résultat d'un processus de déhalogénéation réductrice. Il s'agit de la rupture des liaisons entre atome de carbone et de chlore, les PCB jouant le rôle d'accepteur d'électrons. Plusieurs consortia bactériens capables de dégrader les PCB ont été enrichis et plusieurs voies spécifiques en termes de substrats et de mécanismes ont été mises en évidence. Ces voies de dégradation, au nombre de huit, dépendent de la position des atomes de chlores ainsi que de leurs voisins (Bedard, 2008). Il existe donc plusieurs enzymes nommées déhalogénases avec différentes spécificités.

Les microorganismes capables de déhalogénéation réductrice possèdent un ou plusieurs gènes codant pour une enzyme déhalogénase. Ces gènes sont appelés par le terme générique *rdh* pour « *reductive dehalogenase* ». Ils sont organisés en opéron mais le nombre de gènes et leur position peuvent varier entre ou au sein d'une même espèce. Par exemple, *Dehalococcoides CBDB1*, reconnue comme capable de déhalogénéation réductrice, possède 32 gènes homologues *rdh*, (Kube et al., 2005). Il est à noter que tous les opérons séquencés possèdent en commun les gènes *rdhA* et *rdhB*, souvent co-transcrits. Le gène *rdhA* code pour une sous-unité de la déhalogénase alors que *rdhB* code pour une protéine membranaire hydrophobe permettant l'ancrage de la protéine

RdhA. Les acteurs de la déhalogénéation en condition réductrice peuvent donc être ciblés en recherchant la présence de gène *rdh* (Park et al., 2011).

Les bactéries PCB-déhalorespirantes identifiées sont très peu nombreuses. Les connaissances actuelles des organismes impliqués dans la conversion anaérobie des PCB ont été obtenues soit par des études d'écologie moléculaire appliquées à des cultures d'enrichissement manifestant une déchloration des PCB, soit par des études en cultures pures de bactéries halorespirantes. En 2004, Fennell et al. ont démontré la capacité de *Dehalococcoides ethenogenes* 195 (bactérie isolée en 1997 et déchlurant totalement le perchloroéthène) à déchloration certains PCB. Plus récemment, une étude en culture pure de la bactérie *Dehalococcoides CBD1* a montré sa capacité à déchloration plusieurs congénères de PCB (Adrian et al., 2009). Ces deux bactéries sont à ce jour les deux seules bactéries isolées et séquencées capable des déchloration les PCB (Kube et al., 2005; Seshadri et al., 2005). La bactérie *O-17*, identifiée comme appartenant au phylum des *Chloroflexi* est issue d'une culture d'enrichissement ortho déchloration obtenue par Cutter et al. (1998), sur des sédiments marins dopés par un seul PCB. Grâce à des profils DGGE sur le gène de l'ADNr 16S, ces auteurs ont démontré une corrélation entre croissance d'un seul phylotype et activité déhalogénante sur le 2,3,5,6-tétrachlorobiphényle (Cutter et al. 2001). Des études en culture pure menées par May et al. (2006) ont révélé la capacité de cette bactérie à déchloration plusieurs congénères de PCB. La bactérie *DF-1* (phylum des *Chloroflexi* hors du genre *Dehalococcoides*) a aussi été identifiée par des analyses en DGGE de l'ADNr 16S à partir d'un enrichissement, connu comme étant capable de déchloration en position para du 2,3,4,5-tétrachlorobiphényle (Wu et al. 2000; Wu et al. 2002a; Wu et al. 2002b). May et al. (2008) que cette souche ne peut se développer qu'en co-culture avec une souche de *Desulfovibrio sp.* Plusieurs autres phylotypes capables de déchloration les PCB ont été mis en évidence comme les phylotypes *DEH10* (genre *Dehalococcoides*) et *SF1* (phylum *Chloroflexi*) (Kjellerup et al. 2008; Fagervold et al. 2007).

L'étude moléculaire des populations PCB -déhalorespirantes peut donc se faire soit en ciblant le gène fonctionnel *rdh*, soit par une approche phylogénétique via des amorces ciblant l'ADNr 16S soit du phylum *Chloroflexi*, soit ciblant un genre plus spécifique comme *Dehalococcoides*.

Il est à noter qu'en général le phylum des *Chloroflexi* est bien représenté dans les inventaires moléculaires effectués sur des réacteurs de digestion anaérobie (Nelson et al. 2011; Werner et al. 2011). Ces microorganismes ne sont pas eux-mêmes des microorganismes méthanogènes, mais leur présence parmi les principaux phyla révèle leur participation à un fonctionnement général de l'écosystème. Le fait que ce phyla soit aussi impliqué dans la PCB-déhalorespiration appuie l'hypothèse que production de méthane et déhalogénéation ne sont pas directement reliés par des microorganismes

réalisant les deux fonctions. Au vu des souches déjà isolées comme PCB-halorespirantes, on peut émettre l'hypothèse que les microorganismes méthanogènes peuvent être important thermodynamiquement mais n'en sont peut-être pas les acteurs.

I.4. L'étude des communautés microbiennes

I.4.1. Les études en microcosme *versus* systèmes réels

Caractériser et étudier les communautés au sein des systèmes réels s'avère compliqué. En effet, la complexité des systèmes microbiens (diversité des acteurs, des fonctions...) à laquelle s'ajoute l'influence de paramètres abiotiques (température, pH, luminosité, présence d'oxygène...) dont la variabilité dans l'espace et le temps est difficilement maîtrisable, rend la tâche de l'écologue microbien ardue. Les études en systèmes réels reposent essentiellement sur des travaux de caractérisations des individus ou des fonctions connues du système. Si aujourd'hui les performances et la puissance des outils de caractérisation génétique permettent de réaliser de grands inventaires microbiologiques, l'étude des fonctions des systèmes repose toujours sur des connaissances (gènes, enzymes impliqués...) acquises dans un premier temps sur des systèmes simplifiés.

Pour pouvoir étudier des procédés, l'emploi de systèmes simplifiés et miniaturisés par rapport aux systèmes réels s'est avéré une stratégie nécessaire et efficace. Les études en microcosme permettent entre autres d'étudier une population microbienne donnée dans des conditions environnementales définies. D'autre part, l'étude de l'influence des variations de ces conditions environnementales est alors possible, en faisant varier les paramètres opératoires du système mis en place. Par rapport aux cultures pures, elles permettent de conserver la diversité et la complexité des communautés microbiennes tout en maîtrisant les conditions environnementales.

La miniaturisation des expériences permet aussi de multiplier les répliques et ainsi d'appréhender les phénomènes de divergence des communautés en relation avec la fonction étudiée. La réplication d'une même expérience, tout comme celle des analyses découlant de l'expérimentation permet aussi de valider statistiquement les résultats obtenus.

I.4.2. Appréhender l'étude des communautés microbiennes

Dans les études en microcosme, plusieurs échelles peuvent être envisagées et des outils ont été développés pour chacune d'elles. Deux types d'approche peuvent être menées : une approche « individu » (visant à répondre à la question : « quelles espèces sont présentes ? »), une approche « fonctionnelle » (répondant à la question : « quelles fonctions sont présentes et/ou réalisées »).

L'approche « individu » se base essentiellement sur la caractérisation, l'identification et la quantification des microorganismes présents. Les techniques d'inventaire sont très utilisées dans ce type d'étude. Basées, dans un premier temps, sur des processus de culture/isolement/séquençage, elles se sont fortement développées avec l'essor de la biologie moléculaire en utilisant les techniques basées sur l'amplification et/ou le séquençage de l'ADN 16S, directement à partir de l'échantillon, sans étape de culture préalable, on parle alors d'approche « neutre ».

L'approche « fonctionnelle » quant à elle, se base sur la réalisation, ou non, de fonctions générales ou spécifiques du microcosme étudié. Concrètement, il s'agit de détecter et/ou de quantifier, dans l'échantillon, un ou des gènes indispensables à la réalisation de la fonction étudiée. Cette stratégie d'étude, suivant le degré de connaissances acquises sur la fonction étudiée, peut être appréhendée à différentes échelles (phylogénétique, génétique...). Par exemple, l'étude de la présence de gènes fonctionnels permet de mettre en évidence une réalisation possible de la fonction étudiée (par exemple : la présence du gène *bssA* impliqué dans les processus de dégradation du toluène), l'étude des ARN quant à elle permet de s'assurer de la réalisation effective de celle-ci. Dans bon nombre de cas, (y compris la dégradation en condition anaérobie des HAP, PCB et NP) les gènes responsables de la fonction étudiée ne sont pas mis en évidence, des approches phylogénétiques permettent alors de dégager des phyla connus pour réaliser cette fonction (par exemple, le phylum *Chloroflexi* est étudié lors des processus de dégradation des PCB).

I.4.3. Les outils d'étude des communautés microbiennes

Pendant de nombreuses années, la microbiologie « classique » s'est basée sur des techniques culturales, principalement sur l'enrichissement des microorganismes puis leur isolement. L'enrichissement permet de favoriser le développement de communautés selon les conditions physico-chimiques et nutritionnelles du milieu. Le milieu de culture, suivant sa composition, exerce sur les communautés une pression de sélection plus ou moins forte. Si ces méthodes permettent toujours l'étude simplifiée des écosystèmes et l'isolement de nouvelles espèces bactériennes reliées à une fonction (comme la dégradation d'un substrat), l'inconvénient majeur de ces méthodes est de ne refléter qu'une vision partielle de la réalité. Les cultures ne permettent de caractériser que les microorganismes dits « cultivables » qui ne représenteraient qu'entre 0,001% et 15% de la diversité totale (Amann et al., 1995).

Les outils de la biologie moléculaire ont permis de donner une vision plus complète de la diversité des écosystèmes microbiens. La microbiologie moléculaire, basée sur la technique d'amplification PCR (« *Polymerisation Chain Reaction* ») et sur l'utilisation de l'ADNr 16S comme marqueur moléculaire des espèces, s'est popularisée. Il est possible

actuellement de réaliser des inventaires moléculaires directement à partir des ADN génomiques extraits des échantillons.

De tels inventaires ont permis de grandes avancées, notamment la découverte du domaine des archées mais ils restent relativement fastidieux et coûteux. En effet, ces méthodes ne permettent pas d'accéder à une vision dynamique des écosystèmes qu'apportent les empreintes moléculaires.

Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons différents outils moléculaires pouvant être utilisés pour l'étude des communautés microbiennes et l'attention du lecteur sera portée sur ceux employés dans notre étude. Ces outils peuvent soit être employés sur l'ARNr 16S de microorganismes, donnant une vision globale de la communauté microbienne, soit cibler des phyla ou des gènes spécifiques d'une fonction, donnant alors une vision fonctionnelle de la communauté.

I.4.3.1. La quantification

De nombreuses méthodes permettent la quantification des microorganismes dans différents milieux. Les méthodes microscopiques de comptage direct, par épifluorescence (coloration DAPI) ou en microscopie électronique et la cytométrie de flux permettent un comptage des cellules. Comptage, dont l'efficacité sera en partie dépendante du degré d'agrégation des cellules dans le milieu. Dans le cas des écosystèmes de type boue, le caractère agrégatif de cette dernière et la présence dans le milieu de molécules pouvant engendrer un bruit de fond important en épifluorescence rend ces comptages fastidieux. Travailler sur les extraits d'ADN, paraît donc un bon moyen de se libérer de ces contraintes.

De ce fait, l'utilisation de la PCR quantitative (Q-PCR) est une méthode efficace pour quantifier les microorganismes présents dans la boue. Il s'agit d'une technique permettant de suivre la réaction d'amplification d'un gène d'intérêt en temps réel dans le but de quantifier la séquence cible de l'échantillon. Cette technique couple une amplification PCR normale à la quantification d'un signal fluorescent. Durant la phase exponentielle d'amplification, l'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre de molécules amplifiées, lui-même proportionnel au nombre de molécules cibles dans la matrice. La quantification peut être absolue (basée sur l'utilisation d'une gamme étalon d'intérêt dont on connaît la concentration) ou relative (basée sur le calcul du niveau d'expression du gène cible par rapport à un ou plusieurs gènes de référence de concentration initiale inconnue). Deux systèmes permettent classiquement de réaliser une Q-PCR, le système SYBR Green I et le système TaqMan (Figure I-20).

Le SYBR Green est une molécule qui s'intercale uniquement dans l'ADN double brin et qui ne fluoresce que lorsqu'il est lié à l'ADN. Cette technique est applicable quelles que soient les amorces utilisées. A chaque cycle d'élongation, ce fluorophore s'intercale entre

les nouveaux brins formés, entraînant une augmentation de l'intensité de fluorescence proportionnelle au nombre de copies.

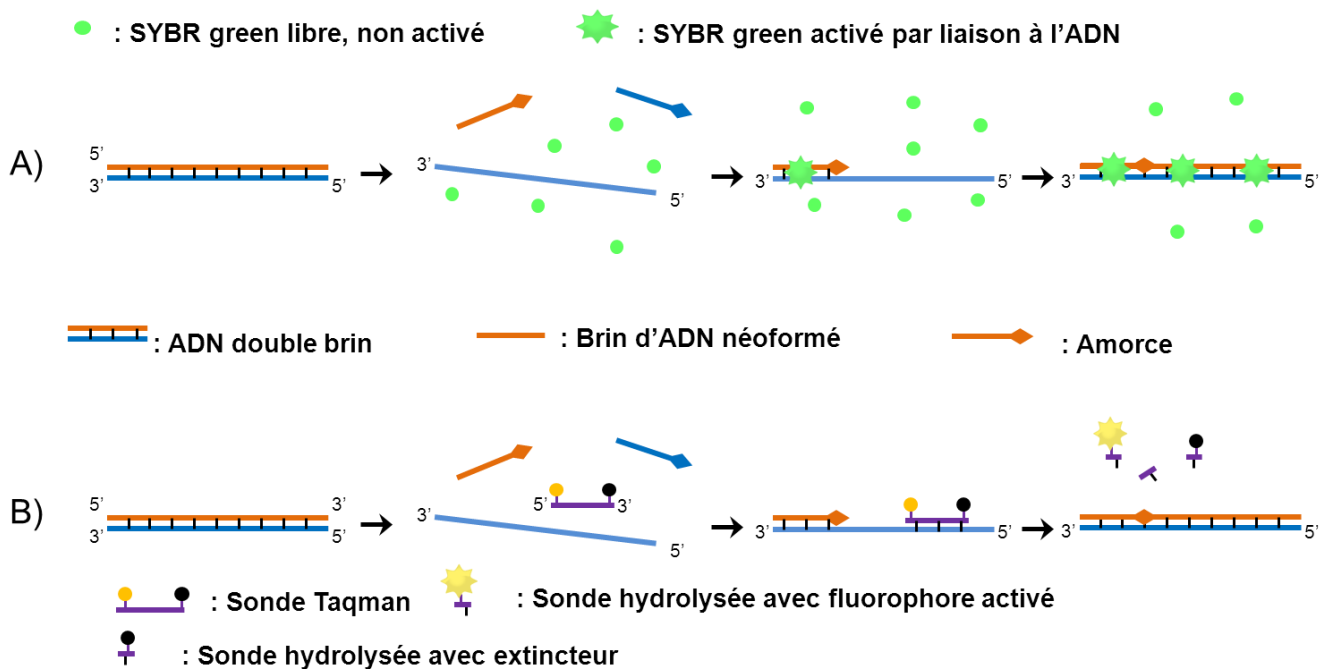


Figure I-20: Principe de la Q-PCR avec les systèmes SYBR Green (A) et TaqMan (B)

Le système TaqMan est basé sur l'hybridation d'une sonde interne TaqMan en plus des deux amorces externes de la PCR. Cette sonde est marquée par un fluorophore (« Reporter ») fixé en 5' et possède un extincteur (« Quencher ») fixé en 3'. Quand le « Quencher » se trouve spatialement proche du Reporter, celui-ci absorbe l'énergie du « Reporter » et la transforme en chaleur. A l'inverse quand le « Quencher » est éloigné, le « quenching » ne fonctionne plus et la fluorescence est visible. Au cours de la polymérisation, la Taq polymérase (grâce à son activité exonucléasique) dégrade la sonde interne située sur son chemin et libère le « Reporter » du « Quencher » qui émet alors la fluorescence.

I.4.3.2. Les empreintes moléculaires

Les empreintes moléculaires permettent d'avoir rapidement une image représentative de l'ensemble de la communauté. Elles se basent sur la mise en évidence de la variabilité de longueur et/ou de séquence nucléotidique des fragments amplifiés. De nombreuses méthodes ont été développées ; citons en exemple la T-RFLP (basées sur le traitement, par des enzymes de restriction, des brins amplifiés par PCR, engendrant ainsi des fragments de tailles différentes séparables par électrophorèse), les méthodes d'électrophorèse sur gel en gradient (DGGE, TTGE, TGGE, basées sur une dénaturation différentielle du double brin d'ADN selon sa composition en bases G et C face à un agent dénaturant).

La technique d'analyse de polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simples brins par électrophorèse capillaire (CE-SSCP) est une méthode basée sur la migration différentielle des brins d'ADN simple brin selon leur structure secondaire (Figure I-21). Contrairement à la DGGE, TGGE ou TTGE, la migration est réalisée dans un séquenceur équipé de capillaires. Elle est de fait plus précise, reproductible et permet d'analyser un plus grand nombre d'échantillons. Le principe de cette méthode est que l'une des deux amorces utilisées en PCR est marquée par un fluorophore ce qui aboutit au marquage d'un seul des deux brins des fragments néoformés. Les fragments sont ensuite dénaturés thermiquement (à 95°C) puis refroidis brusquement (à 0°C). Chaque fragment d'ADN simple brin adopte alors une conformation tridimensionnelle secondaire unique et répétable. Cette conformation est maintenue par la formamide déionisée. Elle dépend : *i*) de la composition en bases azotées (A, G, C ou T) du fragment d'ADN et *ii*) de l'ordre de succession de ces bases azotées. Les ADN simples brins vont ensuite migrés électrophorétiquement dans un capillaire. La masse moléculaire et la structure secondaire de chaque brin est à l'origine d'une migration différentielle des fragments. Lors de leur passage devant un détecteur laser, l'intensité de fluorescence émise, proportionnelle au nombre de brins marqués de même conformation, est transcrite sous la forme d'un pic. Chaque pic est représentatif d'une « espèce moléculaire ». Il faut cependant noter que des phénomènes de co-migration peuvent intervenir et que plusieurs espèces différentes peuvent générer le même pic.

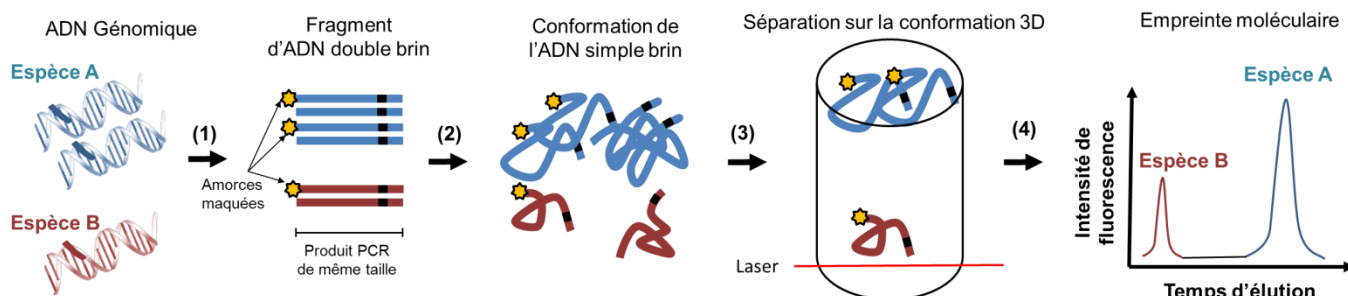


Figure I-21: Principe de la CE SSCP

(1) Amplification PCR, (2) Dénaturation, (3) Electrophorèse capillaire, (4) Obtention d'un chromatogramme.

I.4.3.3. Le séquençage

Le principe du séquençage est de déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'une séquence donnée. Traditionnellement, le séquençage était réalisé par une méthode de clonage suivi d'un séquençage de type Sanger. Les fragments d'ADN générés par l'amplification d'un gène d'intérêt (souvent l'ADNr 16S) sont insérés au sein d'un plasmide. Ce dernier est ensuite introduit dans une cellule hôte (comme *Escherichia coli*). Les cellules sont alors isolées et mises individuellement en culture. Chaque clone peut alors être séquençé par le protocole de Sanger qui repose sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN. Il s'agit d'une amplification classique avec l'ajout

d'une faible concentration de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués par des fluorophores différents. Lors de la phase d'élongation, l'intégration d'un de ces ddNTP à la chaîne de synthèse provoque l'arrêt de celle-ci. Il en résulte des fragments de taille diverses qui vont être séparés par électrophorèse. La couleur de fluorescence des différentes bandes du gel permet d'attribuer le nucléotide (A, T, G, C) à chaque paire de base. C'est une approche longue et coûteuse qui est de plus en plus remplacée par les nouvelles générations de séquençage (NGS), comme le pyroséquençage.

Le pyroséquençage utilisant la technologie 454-FLX Titanium a pour avantage de s'affranchir de l'étape de clonage, d'être rapide et moins coûteux. Les échantillons d'ADN sont amplifiés dans une émulsion de fines gouttelettes (évitant ainsi l'étape de clonage), puis sont fixés sur des billes et placés dans des micropuits où s'effectuent le pyroséquençage. Cette méthode consiste à lire le nucléotide (A, T, G, C), dès qu'il s'incorpore à la séquence en synthèse (Figure I-22). Chaque nucléotide est donc incorporé successivement à la réaction (par opposition aux méthodes classiques d'amplification PCR). Chaque nucléotide incorporé dans le brin d'ADN en synthèse libère un pyrophosphate (PPi). Ce PPi est transformé en ATP par une ATPsulfurylase et une luciférase couple cet ATP à une luciférine. Le produit de ce couplage est une oxyluciférine qui émet un signal lumineux qui va pouvoir être capté par le scanner du séquenceur. Le surplus de nucléotides dans le milieu est dégradé par une apyrase. Le processus peut alors se poursuivre avec l'ajout d'un autre nucléotide.

En utilisant la technologie de pyroséquençage 454-FLX Titanium, par exemple, on obtient rapidement environ 1.000.000 séquences d'une longueur moyenne d'environ 300 à 500 paire de bases en un cycle.

Une fois les séquences obtenues et après un travail de nettoyage de celles-ci, commence le travail d'affiliation. L'affiliation consiste à associer chaque séquence à sa taxonomie. Cette étape est réalisée en comparant les séquences obtenue à des bases de données à l'aide d'un algorithme appelé BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, Stephen et al., 1990).

Une autre technologie de séquençage à haut débit est la technologie Illumina qui allie les avancées technologiques des puces à ADN et d'une variante de la technique de Sanger appelé CRT pour « cyclique reversible termination ». Cette technique, basée sur le principe de séquençage par incorporation réversible de nucléotides fluorescents et sur la lecture optique de la fluorescence, s'affranchit donc du recours à l'électrophorèse.

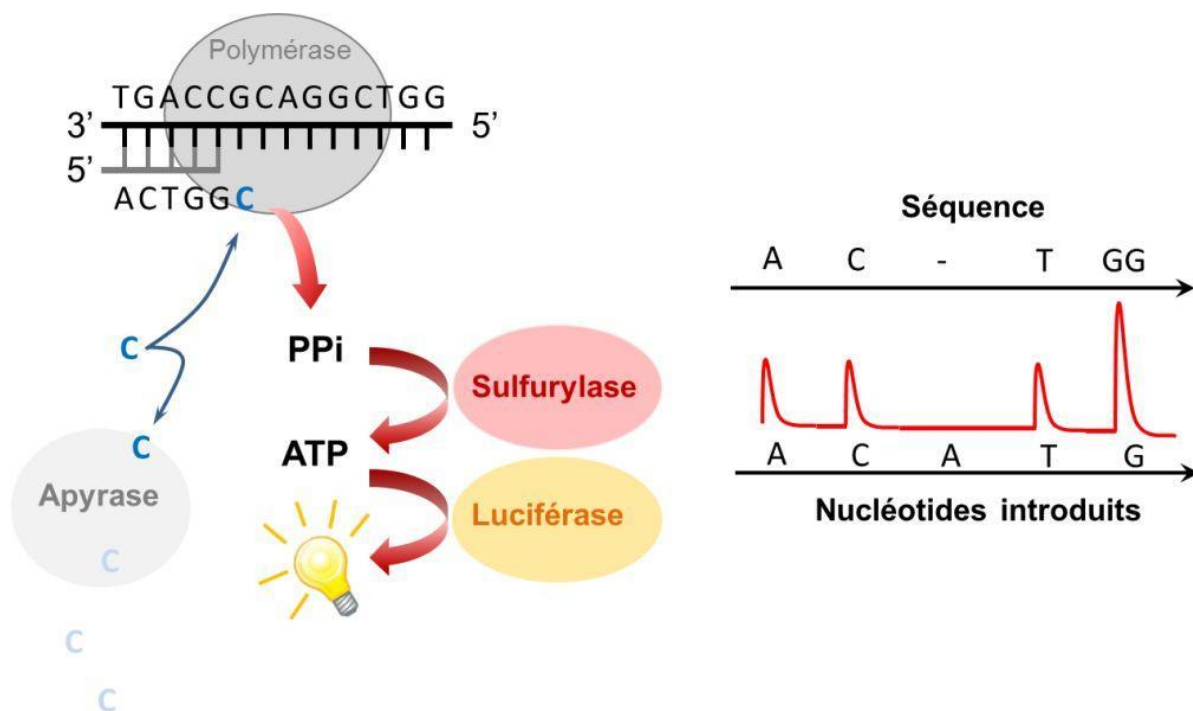


Figure I-22: Principe du pyroséquencage

I.5. Problématique de l'étude

Les perturbateurs endocriniens et plus particulièrement les HAP, PCB et NP sont des molécules qui transitent par nos systèmes de traitement des eaux. Bien qu'éliminés de la phase aqueuse lors du processus d'épuration des eaux, ils se retrouvent majoritairement sorbés sur la boue du fait de leurs propriétés hydrophobes.

La digestion anaérobie est un procédé qui permet de valoriser les boues de station d'épuration par la production de biogaz mais permet aussi de les stabiliser. L'épandage sur des terres agricoles des boues digérées préoccupe actuellement les autorités sanitaires et politiques ainsi que les agriculteurs, soucieux de la présence et de l'impact de telles molécules sur les sols, les productions agricoles et les écosystèmes qui les entourent. Or, le procédé de digestion anaérobie permet l'élimination de certains micropolluants comme les HAP, NP et PCB. Il a donc été choisi comme procédé modèle de notre étude.

Les mécanismes d'élimination de ces molécules en condition méthanogène restent pour le moment peu connus. S'il apparaît que les phénomènes de sorption jouent un rôle prépondérant dans l'élimination de ces molécules des eaux usées, ils ne représentent en soit pas de réels processus d'élimination mais plutôt un transfert de la pollution à la fraction boue. Dans la boue, l'élimination observée peut être la résultante de phénomènes de volatilisation (peu présents en réacteur anaérobie et observables uniquement pour les HAP et PCB de faible poids moléculaire), de sorption irréversible (formation de résidus liés non extractibles) ou de transformation par voie physico-

chimique ou biologique. Les résultats portant sur la digestion des boues en condition anaérobie ont montré une forte implication des phénomènes de transformation biologique (confrontation de résultats de réacteurs abiotique et biotique). Les communautés microbiennes jouent donc un rôle clé dans l'élimination des micropolluants en condition anaérobie mais les acteurs et les fonctions, impliquées dans cette dégradation, sont peu, voire pas, identifiés, particulièrement en condition méthanogène. L'objectif général de cette thèse est donc d'apporter des connaissances quant au rôle des communautés microbiennes dans la dégradation de micropolluants organiques au cours de la digestion, en condition méthanogène, de boue faiblement contaminées en ces molécules.

Ces communautés peuvent avoir une influence sur les processus de dégradation via par exemple les caractéristiques intrinsèques de la communauté telles que le nombre d'espèces, l'abondance des espèces, l'expression par certaines espèces de fonctions plus ou moins spécifiques, ... L'historique des pollutions d'un écosystème peut entre autres influencer la spécialisation des communautés microbiennes à dégrader un type particulier de molécules. Dans nos travaux, nous avons donc cherché à étudier si l'origine d'une communauté peut entraîner des différences dans l'expression d'une fonction de dégradation de micropolluants organiques.

L'étude de la méthanisation se réalise souvent dans des réacteurs continus afin de se rapprocher le plus des conditions réelles de traitement industriel. Les systèmes employés sont des systèmes clos contenant une boue ayant montré une capacité de digestion « boue inoculum » que l'on mélange à une autre boue servant de substrat. Dans de telles expériences, on comprend aisément que les microorganismes présents dans la boue inoculum mais aussi dans la boue substrat peuvent jouer un rôle dans les différents processus réalisés par l'écosystème : il est alors difficile de savoir quelle fonction est imputable aux microorganismes des différentes boues. Dans notre étude, visant à comparer les potentialités de plusieurs inocula différents, il nous a donc paru important de s'affranchir de ce biais. De ce fait, nous avons adopté une stratégie expérimentale nous permettant d'affirmer que les observations faites étaient imputables uniquement aux communautés, choisies comme objet d'étude et inocula, et non aux populations présentes dans la boue servant de substrat. La mise en place de protocoles permettant, d'une part d'extraire les microorganismes d'intérêt de leur écosystème d'origine et d'autre part, d'éliminer les microorganismes présents dans le substrat ont donc été les premiers enjeux de ce travail.

Par ailleurs, pour s'affranchir des variations de biodisponibilité de substrat et de micropolluants imposée par le couple matrice/micropolluant sur les phénomènes de biodégradation, nous avons soumis chaque inoculum à la même boue d'alimentation dans les mêmes conditions opératoires. Cette démarche expérimentale nous permet

donc d'imposer à trois communautés microbiennes différentes la même pression de sélection vis-à-vis du substrat et des micropolluants ce qui nous permettra de mieux appréhender le potentiel métabolique des systèmes et les facteurs qui l'influencent, (i) à la fois dans sa globalité, en étudiant les paramètres de dégradation de la matière et (ii) dans sa spécificité en étudiant le devenir des micropolluants (Figure I-23).

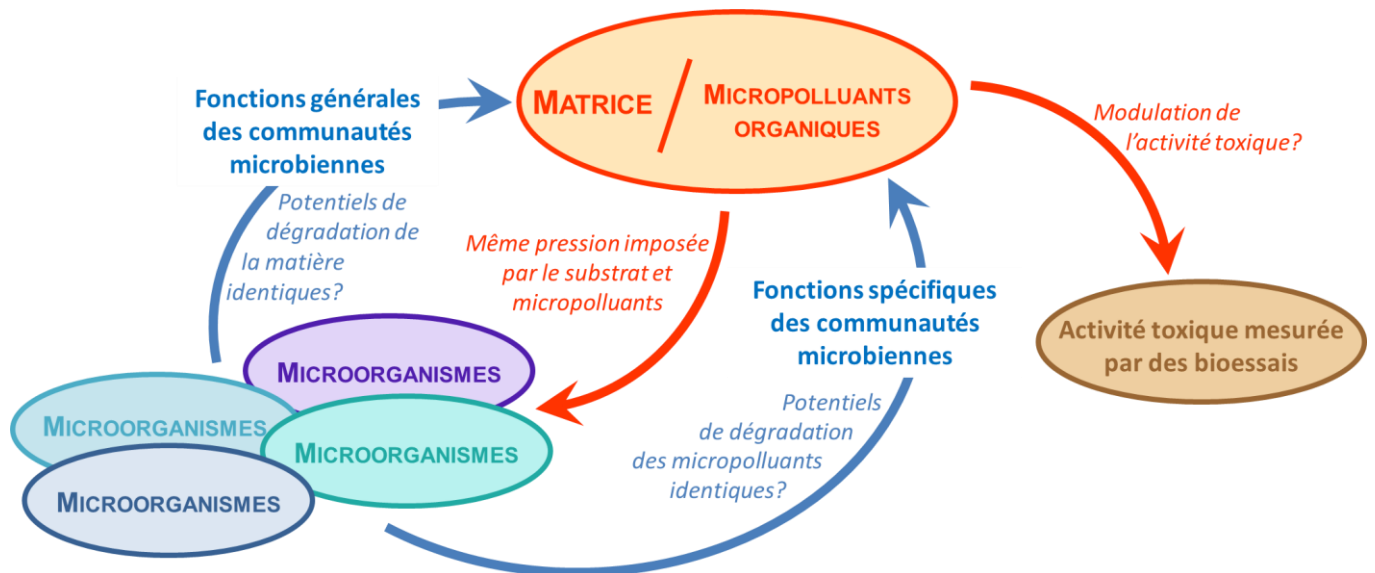


Figure I-23: Représentation des interactions et rétroactions imposées par le protocole expérimental

Si étudier la présence et la dégradation des micropolluants organiques est un axe important de notre travail, l'expression de leur potentiel toxique, par l'expression d'une perturbation endocrinienne, ne doit pas être oubliée. Grâce à notre stratégie expérimentale, ce potentiel toxicologique est conditionné initialement par la biodisponibilité de micropolluants dans la boue d'alimentation. Nous pourrions donc observer si l'expression du potentiel de digestion de la matière et des micropolluants, par différentes communautés microbiennes, peut moduler l'expression de la toxicité des substances lors du processus de digestion anaérobie.

Enfin ce travail, s'attachera à mieux identifier la présence d'acteurs et de fonction de dégradation en condition méthanogène en se basant d'une part sur la présence de gènes marqueurs avec différents outils moléculaires (permettant de mettre en évidence des potentiels de dégradation chez des communautés microbiennes anaérobies) et d'autre part en suivant le devenir d'un micropolluant marqué isotopiquement.

Chapitre II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre détaille l'ensemble du matériel et des méthodes mis en œuvre dans ce travail. Il décrit dans un premier temps le dispositif expérimental de suivi des communautés microbiennes et de devenir des micropolluants au cours de la digestion anaérobie. Puis, l'ensemble des méthodes analytiques couplées à ce dispositif est détaillé et enfin les outils d'analyse des données sont présentés.

II.1. Dispositif expérimental des réacteurs anaérobies

Dans le but d'étudier l'influence des communautés microbiennes sur le devenir de micropolluants en condition méthanogène, des réacteurs anaérobies sont mis en place. Préalablement à la mise en place des réacteurs, les microorganismes sont extraits des écosystèmes d'intérêt de manière à s'affranchir de la variabilité des matières organiques et minérales (variabilité de la matrice) présentes dans chaque écosystème. La boue d'alimentation est stérilisée et dopée de manière à contenir des concentrations quantifiables de micropolluants organiques, à avoir une charge en micropolluants identique quels que soient les écosystèmes et ne plus contenir de microorganismes viables.

II.1.1. Préparation d'un lot homogène de boue pour l'alimentation des réacteurs

La boue servant d'alimentation pour chaque réacteur se doit d'une part, d'être exempte de tout microorganisme et d'autre part, de posséder tous les micropolluants organiques étudiés à des concentrations connues, quantifiables et constantes au cours du temps. Trouver une boue possédant, à des concentrations quantifiables, l'ensemble des composé étudiés (HAP/PCB/ NP) est difficile. C'est pourquoi nous avons choisi de mettre en place une stratégie de dopage d'une boue initialement non-contaminée. Pour permettre d'éliminer les microorganismes présents dans la boue, une stratégie de stérilisation est mise en place. Plusieurs protocoles sont testés et les résultats de ce travail sont décrits dans le Chapitre IV. Ce paragraphe décrit le protocole final adopté ainsi que les analyses et tests sur la boue stérilisée dopée.

II.1.1.1. Dilution de la boue

La boue choisie pour l'alimentation est une boue secondaire, précédemment utilisée au laboratoire pour des études portant sur la dégradation des micropolluants en condition méthanogène. C'est une boue activée à très forte charge provenant de la STEP de Cergy Pontoise (Val d'Oise). Les contenants utilisés comme réacteur anaérobie sont des flacons Schott de 500 mL. Nous choisissons de travailler avec un volume (V) de réaction de 400 mL (§ II.1.3). Les réacteurs sont alimentés avec une charge volumique appliquée (cva) rencontrée classiquement sur site industriel de $1\text{g}_{\text{DCO}}/\text{L}/\text{j}$, avec un temps de séjour hydraulique (TSH) de 20 jours. Charge appliquée et temps de séjour étant fixés, ils impliquent le débit d'alimentation et de soutirage (Q) de 20 mL/jour et la concentration de l'alimentation à $20\text{g}_{\text{DCO}}/\text{L}$.

La boue de Cergy présentant une DCO initiale de 55 g_{DCO}/L a dû être diluée par ajout d'eau distillée pour obtenir une concentration de :

$$V * c_{va} / Q = 20 \text{ g}_{\text{DCO}}/\text{L}$$

II.1.1.2. Dopage de la boue

Une fois diluée, le lot de boue est scindé en deux de façon à générer (i) un lot de boue stérile non dopée, pour alimenter les 3 réacteurs témoins sans dopage et (ii) un lot dopé, pour alimenter les 9 autres réacteurs.

Afin de réaliser le dopage, un cocktail concentré en HAP/PCB/NP est préparé à partir de solutions concentrées en chaque composé. L'injection d'un petit volume de ce cocktail dans la boue permet d'atteindre les concentrations souhaitées en micropolluants organiques sans modifier les propriétés de la boue. Les 13 HAP et les 7 PCB étudiés sont commercialisés sous formes de poudre (Dr Ehrenstorfer GmbH). Ces poudres sont individuellement dissoutes à 2 ou 4 g/L dans du dichlorométhane selon les molécules (1 g/L pour l'indéno(1,2,3,c,d)pyrène). Le mélange commercial des isomères du nonylphénol a pour forme un liquide visqueux, qui est dilué dans du dichlorométhane pour obtenir une solution à 20 g/L. Ensuite un volume donné de ce cocktail de dopage est obtenu par ajout de 1/20 ou 1/40 de ce volume de chacune des solutions individuelles de HAP et PCB, de 1/10 pour le nonylphénol. Après évaporation sous flux sec d'azote, le mélange est repris dans le volume souhaité d'acétonitrile. Les concentrations obtenues dans la solution de dopage sont de 2 g/L de nonylphénol, 100 mg/L de PCB et d'HAP sauf l'indéno(1,2,3,c,d)pyrène présent à 25 mg/L. Ce dernier est présent en concentration moindre car il est très peu soluble dans l'eau et est donc susceptible de se retrouver en condition de saturation lors des opérations de dopage, de plus il est très coûteux. Le dopage est réalisé sous agitation pour permettre une dispersion homogène de la solution de dopage dans l'ensemble de la boue. Le volume de la solution de dopage ajoutée à la boue représente moins de 1/1000 du volume de boue préparée. La concentration de dopage de référence pour les expérimentations est de 5 mg_{HAP}/kg_{MS}, 1,25 mg_{indéno(1,2,3,c,d)pyrène}/kg_{MS}, 5 mg_{PCB}/kg_{MS} et 100 mg_{NP}/kg_{MS}.

II.1.1.3. Stérilisation de la boue

Une fois les deux lots de boue prêts, chaque lot est réparti dans des bidons autoclavables. Chaque bidon possède un volume de boue permettant l'alimentation, pendant une semaine, des réacteurs non dopés d'une part et des réacteurs dopés d'autre part. L'ensemble des lots est ensuite stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 30 min et conservé jusqu'à son utilisation à -20°C. Avant leur utilisation comme alimentation, les

aliquots de boue sont transférés pendant une nuit à 4°C afin de décongeler, et le pH est ajusté à 7 sous hotte stérile à l'aide d'une solution stérile de NaHCO_3^- à 52 g/L.

II.1.1.4. Caractérisation de la boue stérilisée et test d'activité microbienne

Une caractérisation de la boue est réalisée après dopage et stérilisation pour permettre entre autre le choix du protocole de stérilisation (Chapitre IV). Des tests d'activité microbienne complètent ces analyses dans le but de vérifier l'effet du mode de stérilisation sur la viabilité des microorganismes.

II.1.1.4.1. Caractérisation de la boue dopée et stérilisée

La stérilisation thermique peut avoir plusieurs effets sur les caractéristiques de la boue. Lors du chauffage, des réactions comme la réaction de Maillard peuvent intervenir entre glucides et protéines ; de plus, la lyse cellulaire peut entraîner des modifications de pH et enfin la teneur en micropolluants organiques peut évoluer notamment par des effets de volatilisation des composés les plus légers. Pour toutes ces raisons, une fois le dopage et la stérilisation effectués, la boue est caractérisée suivant différents paramètres : pH, matière sèche et organique (§ II.2.1), DCO totale et du compartiment dissout et colloïdale (§ II.2.2), analyse des concentrations en micropolluants organiques (HAP § II.3.3.1, NP § II.3.4.1) et analyse des concentrations en protéines et glucides.

II.1.1.4.1.1 Dosage des protéines

Les protéines contenues dans les boues totales ou leur phase aqueuse (méthode de séparation décrite § II.3.1.1), sont dosées par la méthode spectrophotométrique de Lowry (Lowry, et al. 1951) basée sur la détection des liaisons peptidiques. La solution de réactifs est un mélange de solution basique (4 $\text{g}_{\text{NaOH}}/\text{L}$) de Na_2CO_3 (20 g/L), de solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 10 g/L, et de solution de tartrate double de potassium et de sodium à 20 g/L, en proportions volumiques 100/1/1.

L'étalonnage est réalisé grâce à des solutions de sérum d'albumine bovine (SAB) à 20, 40, 60, 80 et 100 mg/L.

Dans des tubes à essai, 1 mL d'échantillon ou de standard, 3 mL de solution de réactifs et 0,3 mL de réactif de Folin sont introduits puis placés à l'obscurité durant 2 h. Dans ce milieu alcalin, les ions Cu^{2+} réagissent avec les atomes d'azote des liaisons peptidiques et sont réduits en Cu^+ . Les ions Cu^+ réduisent ensuite le complexe acide phosphotungstique / acide phosphomolybdique contenu dans le réactif de Folin, ce qui confère une coloration bleutée aux mélanges réactionnels. L'absorbance à 750 nm est finalement mesurée pour obtenir la concentration des échantillons en équivalents $\text{g}_{\text{SAB}}/\text{L}$.

II.1.1.4.1.2 *Dosage des glucides*

Le dosage des glucides, dans les boues totales ou leur phase aqueuse (méthode de séparation décrite § II.3.1.1), est basé sur leur réaction avec l'anthrone (Dreywood, 1946). La solution de réactif est préparée par dilution d'anthrone dans de l'acide sulfurique à 98% à raison de 2 g/L.

L'étalonnage est réalisé grâce à des solutions de glucose à 20, 40, 60, 80 et 100 mg/L.

75 µL d'échantillon ou de standard ainsi que 150 µL de solution de réactifs sont disposés dans des puits d'une microplaque 96 puits, puis placés à l'étuve à 105°C durant 10 min. A cette température et en milieu acide, les glucides réducteurs sont déshydratés pour donner des dérivés furfuraliques. Ceux-ci se condensent avec l'anthrone, générant une couleur verte pour les hexoses. Après refroidissement dans de la glace, l'absorbance à 625 nm permet d'obtenir la concentration en glucides en équivalents g_{glucose}/L .

II.1.1.4.2. *Test d'activité microbienne*

L'activité microbienne des boues est évaluée, un jour après leur stérilisation, par des tests de production d'hydrogène selon une technique mise en place au laboratoire de mesure du « Biological Hydrogen Potentiel » (BHP). Les différents échantillons de boue servent d'inoculum à des réacteurs batch anaérobies. La production d'hydrogène de ces réacteurs est mesurée et analysée.

Dans une fiole pénicilline de 500 mL, une source de carbone de type sucre à une concentration finale de 10 g/L et un tampon MES (2-(N-Morpholino) Ethane Sulfonic acide) à 50mM, sont mélangés dans un volume utile de 300 mL de boue à 225 mg_{DCO}/L, soumis préalablement au protocole de dopage/stérilisation. Le tampon est préalablement ajusté à pH 6 et autoclavé. Pour être en condition anaérobie, les fioles sont dégazées à l'aide d'un flux d'azote et sont ensuite placées dans un bain marie à 37°C. Tous les jours, le volume de gaz en surpression dans la fiole est mesuré par la méthode de l'éprouvette renversée (§ II.2.3.3) ainsi que sa composition (§ II.2.3.1). La production réelle d'hydrogène en est déduite.

II.1.2. Extraction des communautés microbiennes issues de trois environnements contrastés

Cette partie a nécessité une mise au point expérimentale décrite dans le Chapitre III de ces travaux. Nous décrivons, ici, le protocole final d'extraction de cellules, obtenus sur les échantillons de sol, sédiment et de boue. Pour extraire les communautés microbiennes de chacun de ces échantillons, une stratégie d'extraction par gradient de densité (inspiré des protocoles d'extraction de cellules de sol) a été appliquée. Dans le cas de la boue un prétraitement enzymatique de l'échantillon est nécessaire.

II.1.2.1. Prétraitement enzymatique de la boue (Braun et al., 2011)

250 mL de boue anaérobie (correspondant à 10g de matière sèche) provenant de la STEP de Lunéville ont été centrifugés à 15000 x g pendant 20 min à une température de 4°C. Le culot obtenu est suspendu dans 250 mL de tampon phosphate 80 mM avec du MgCl₂ à une concentration finale de 20 mM. Pour optimiser l'hydrolyse des exopolymères de la boue, du triphosphate pentasodique (STPP, sigma) a été ajouté au tampon à une concentration finale de 50 mM. Une succession d'enzymes est ensuite appliquée ; il s'agit d' α -amylase, de pectinase, de cellulase et de DNase. Chaque enzyme est ajoutée en excès pour prévenir la possible inhibition de l'activité de l'enzyme par des phénomènes de sorption. Les quantités d'enzymes sont basées sur une estimation générale de la composition en polysaccharides, sucres complexes, cellulose et ADN de la boue (Simon et al., 2009). 20 U d' α -amylase (provenant de *Bacillus sp.*, Duramyl® 300 U.g⁻¹, Sigma), 330 U de pectinase (provenant d'*Aspergillus niger*, 1000 U g⁻¹, Sigma), 5600 U de cellulase (provenant d'*Aspergillus sp.*, Carezyme® 1000 U.g⁻¹, Sigma) et 250 U de DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) sont ajoutés successivement et incubés 1 h, à 37°C. Pour obtenir une activité optimale de chaque enzyme, le tampon est d'abord ajusté à un pH de 5 lors de l'ajout d' α -amylase puis de pectinase, puis à un pH de 7, lors de l'ajout de cellulase et de DNase. La suspension est ensuite centrifugée à 15000 x g, pendant 20 min, à une température de 4°C et le culot obtenu est suspendu dans une solution saline de NaCl (80‰) pour lavage avant que la suspension ne soit de nouveau centrifugée selon les mêmes conditions.

II.1.2.2. Application d'un gradient de densité (Braun et al., 2011)

Dans un erlenmeyer stérile de 100 mL, préalablement placé dans un bac à glace, 10 g d'échantillon (sol, sédiment ou culot de centrifugation de la boue prétraitée enzymatiquement) et 50 mL d'une solution de tampon PVPP sont mixés à vitesse maximum et pendant 90 s (Maron et al., 2006) à l'aide d'un UltraTurax (T15 basic) avant d'être agité (~100 rpm), pendant une nuit, à 37°C. Le tampon PVPP (poly vinyl poly pyrrolidone) est composé de tampon PBS 1× (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂EDTA, pH 7.3), de PVPP (3.5 mg.mL⁻¹), et d'1 % de Tween 20. La sonde de l'UltraTurax aura préalablement été lavée 30 min dans un bain d'acétone placé dans un bain à ultrasons.

20 mL de la solution obtenue sont ensuite prélevés et répartis dans 2 tubes à centrifuger stériles, de 50 mL, en polycarbonate. Sous cette solution, 16 mL de solution de Gentodenz (Gentaur, France) stérile (de densité 1,3 g/mL) sont déposés, à l'aide d'une pipette stérile, comme indiqué sur la Figure II-1 (Barra Caracciolo et al., 2005). La solution de Gentodenz est préparée en dissolvant 40 g de Gentodenz (composé similaire

au Nicodenz, soluble dans l'eau, non ionique, non toxique et dérivé de l'acide benzoïque) dans 50 mL d'eau distillée stérile, comme recommandé par Lindahl et al. (1996).

Les suspensions sont ensuite centrifugées à 10000 x g, pendant 40 min, à une température de 4°C, pour procéder à la séparation de phase entre les particules de l'échantillon et les cellules.

Après centrifugation, on obtient dans le tube la séparation de phase (Figure II-1).

La couche de cellules d'intérêt est prélevée à l'aide d'une micropipette avec un peu du surnageant et un peu de la phase qui contient le Gentodenz dans un bécher stérile de 100 mL.

Cette suspension est ensuite répartie dans plusieurs tubes en polyallomère stériles (environ 10 mL par tube). Le volume est ajusté à 30 mL avec de l'eau saline stérile (NaCl 80‰) et centrifugée à 16000 x g, pendant 60 min, à 4°C, pour éliminer les résidus de Gentodenz. Pour chaque écosystème, les culots obtenus à partir des 10 g de matières sont regroupés et récupérés dans 20 mL une solution saline stérile (NaCl 80‰).

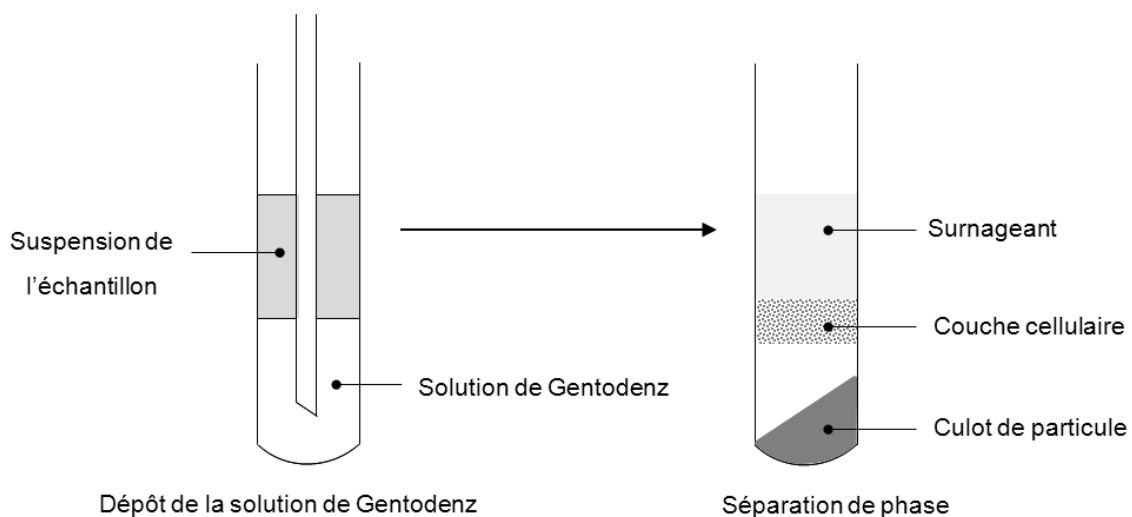


Figure II-1: Schéma des étapes d'établissement du gradient (Barra Caracciolo et al., 2005)

II.1.3. Les réacteurs anaérobies

La digestion anaérobie est conduite dans des fioles de 500 mL fermées par un bouchon à trois sorties : une sortie gaz fermée par un septum à jupe retournée, une sortie permettant l'alimentation et enfin une troisième prolongée dans le flacon par un tube permettant le prélèvement de la boue digérée (Figure II-2). Elle est menée dans une chambre thermostatée à une température de 35°C et le soutirage et l'alimentation se font quotidiennement et manuellement sous une hotte stérile. Dans un souci d'homogénéité du volume de réaction, les réacteurs sont mélangés en continu à l'aide d'agitateurs magnétiques. Les réacteurs sont tous disposés sur une même plaque d'agitation ce qui permet d'avoir une vitesse d'agitation identique pour chacun (Figure

II-3). Quatre réacteurs sont menés pour chaque inoculum : un réacteur est alimenté avec de la boue non dopée et les trois autres réalisés avec la boue dopée. Ces répliqua nous permettent de différencier les phénomènes de divergence des communautés microbiennes qui apparaissent entre répliqua, des différences entre conditions.



Figure II-2: Un réacteur anaérobie

Dans un premier temps les réacteurs sont conduits en fedbatch, pour éviter l'orientation vers des voies fermentaires et permettre aux communautés de s'adapter plus facilement aux conditions opératoires. Chaque échantillon de microorganismes extraits d'un écosystème d'intérêt (sol contaminé en HAP, sédiment contaminé en PCB et boue de STEP) sert d'inoculum à un volume de 100 mL de boue stérilisée dopée (ou non) diluée à 1 g_{DCO}/L . Les fioles sont soumises à un flux d'azote (stérilisé par filtration), pendant quelques minutes, pour permettre la mise en place de l'anaérobiose. La production de biogaz est suivie à la fois quantitativement et qualitativement. En fonction des quantités de méthane produit, la charge est progressivement augmentée jusqu'à obtenir un volume réactionnel de 400 mL et une charge volumique appliquée de 1 $g_{DCO}/L/j$ (période d'environ 100 jours).



Figure II-3: Dispositif expérimental des réacteurs anaérobies

Une fois ce volume atteint, les réacteurs sont menés en régime semi-continu avec un TSH de 20 jours. Le régime semi-continu appliqué peut être assimilé à un régime continu. Les sorties de chaque réacteur sont conservées séparément à 4°C sur une période de 10 jours (correspondant à un demi TSH). Tous les 10 jours, les différents réservoirs de sortie servent aux analyses de suivi de réacteurs décrites dans le paragraphe suivant, aux analyses de suivi des micropolluants organiques décrites dans le paragraphe II.3 et aux analyses de biologie moléculaire décrites dans le paragraphe II.4. Ces mêmes analyses sont effectuées à chaque changement de flacon d'alimentation. Les différents prélèvements se font sous hotte stérile. Les expériences sont menées simultanément pour chaque inoculum jusqu'à obtention et maintien d'un équilibre de dégradation de la matière (100 jours).

Un récapitulatif des différentes analyses menée sur les boues de sortie des réacteurs est présenté en fin du chapitre matériel et méthode (Figure II.7).

II.2. Suivi des paramètres des réacteurs anaérobies

II.2.1. Mesure de la matière sèche et de la matière organique

Dans un creuset en céramique séché et pesé (masse T), environ 30 mL d'échantillon (boue totale) sont introduits. Le creuset est ensuite pesé afin de déterminer la masse exacte introduite (m_0), puis placé à l'étuve à 105°C durant 24 h afin d'évaporer l'eau. A sa sortie du four, le creuset est placé dans un dessiccateur pour refroidissement avant d'être pesé à nouveau (m_{105}). Cette étape nous permet d'obtenir la concentration en matière sèche de l'échantillon par le calcul suivant :

$$MS \text{ (g/kg)} = \frac{m_{105}(g) - T(g)}{m_0(g) - T(g)} * 1000$$

Le creuset est, enfin, déposé dans un four à 550°C pendant 2 h, et pesé à nouveau (m_{550}) après refroidissement dans un dessiccateur. A la fin de cette étape, il ne reste dans le creuset que la matière minérale et la concentration en matière volatile (MV) ou matière organique (MO) est obtenue par le calcul suivant :

$$MV = MO \text{ (g/kg)} = \frac{m_{105}(g) - m_{550}(g)}{m_0(g) - T(g)} * 1000$$

II.2.2. Mesure de la demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène (DCO) des boues totales ou de leur phase aqueuse (méthode de séparation décrite § II.3.1.1), est mesurée à l'aide de kits Spectroquant (Merck), en accord avec la norme ISO 15705. La DCO de la phase particulaire est déduite de la différence de ces deux mesures. Les tubes commercialisés contiennent un excès de

bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) qui permet l'oxydation totale de la matière de l'échantillon après 2 h en conditions acides et à $150^\circ C$. 2 mL d'échantillon sont introduits par tube. La détection par spectrophotométrie s'applique dans la gamme 0 à $1500 \text{ mg}_{O_2}/L$.

II.2.3. Quantification et analyse du biogaz

La quantification du biogaz total et l'analyse de sa composition, nous ont permis de quantifier les volumes de chaque gaz produits (H_2 , CO_2 , CH_4).

Initialement, le volume de biogaz émis est évalué en utilisant un système d'éprouvette renversée mais dans un souci de précision, une mesure par différentiel de pression a rapidement été adoptée.

II.2.3.1. Analyse de la composition du biogaz

La composition du biogaz produit par les systèmes anaérobies est déterminée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). La CPG permet de séparer des composants d'un mélange afin de les identifier et de les quantifier. Elle utilise un gaz vecteur comme éluant (phase mobile) et la phase stationnaire solide, se trouve sur la paroi de la colonne. Les composés migrent plus ou moins vite dans la colonne selon leur affinité avec l'éluant. Il est alors possible de les identifier grâce à leur temps de rétention.

0,5 ou 1 mL d'échantillon gazeux est prélevé dans le ciel gazeux du réacteur à l'aide d'une seringue et injecté dans un chromatographe (GC-8A, Shimadzu). Deux colonnes en série permettent la séparation des différents gaz. La première colonne (Hayesep Q, Touzart & Matignon), garnie de Silicagel (d'une longueur de 2 m, d'un diamètre de 3,175 mm, d'une granulométrie de 80 à 100 mesh), permet la séparation du CO_2 . Les autres gaz sont séparés grâce à la seconde colonne, qui est un tamis moléculaire de 5 Å (Touzart & Matignon) de même longueur, diamètre et granulométrie que la colonne précédente. Les deux colonnes sont séparées par une colonne à vide de 10 m de long qui ralentit le passage du gaz au niveau du tamis moléculaire.

Les molécules sont entraînées par un gaz vecteur, de l'argon, à 2,8 bars. La détection est réalisée à l'aide d'un catharomètre dont le courant est fixé à 80 mA. Le four à colonne est réglé à $30^\circ C$, alors que l'injecteur et le détecteur opèrent à $100^\circ C$. La composition de l'échantillon est déterminée par un étalonnage externe. Le gaz étalon utilisé est composé de 25 % volumique de CO_2 , 2 % d' O_2 , 5 % d' H_2 , 10 % de N_2 et 58 % de CH_4 .

II.2.3.2. Quantification du biogaz produit par suivi de pression

La pression, P_j , à l'intérieur du système est mesurée le jour du prélèvement, à l'aide d'un manomètre piqué dans la bouteille. Le volume de gaz produit (ΔV_j) est alors calculé

aux conditions normales de pression et température (CNTP), via la détermination du nombre de moles (ΔN_j), de la manière suivante:

$$\Delta N_j = (y_j P_j V_h / R T_j) - (y_{j-1} P_{j-1} V_h / R T_{j-1})$$

$$\Delta V_j = \Delta N_j R T_0 / P_0 = \Delta N_j * 8.314 * 273.15 / 10^5 (*10^6 \text{ mL pour l'avoir en mL})$$

Avec :

- y_j et y_{j-1} , les teneurs du gaz étudié dans le biogaz total, exprimées en pourcentage, mesurées respectivement le jour du prélèvement et lors du prélèvement précédent.
- P_j et P_{j-1} , les pressions en Pa mesurées le jour du prélèvement et après le prélèvement précédent.
- $P_0 = 10^5$ Pa, condition normale de pression
- $T_0 = 273,15$ K, condition normale de température
- V_h , le volume du ciel gazeux dans le flacon en m^3
- R , la constante des gaz parfaits
- T , température en Kelvin

II.2.3.3. Quantification du biogaz produit par l'utilisation d'une éprouvette renversée

Le volume de biogaz produit est mesuré en piquant le septum de la sortie gaz du flacon à l'aide d'une aiguille. Cette aiguille est reliée à un tuyau dont l'autre extrémité est placée dans une éprouvette renversée remplie d'eau. La surpression s'évacue de la bouteille et entraîne une diminution du volume d'eau dans l'éprouvette ce qui permet de mesurer le volume de gaz en surpression dans le flacon.

Le volume de gaz produit (ΔV_j), entre deux prélèvements, est alors calculé aux conditions normales de pression et température (CNTP), via la détermination du nombre de moles (ΔN_j), de la manière suivante:

$$\Delta N_j = (y_j P_{\text{salle } (j)} V_h / R T_j) - (y_{j-1} P_{\text{salle } (j-1)} V_h / R T_{j-1})$$

$$\Delta V_j = \Delta N_j R T_0 / P_0 = \Delta N_j * 8.314 * 273.15 / 10^5 (*10^6 \text{ mL pour l'avoir en mL})$$

Avec :

- y_j et y_{j-1} , les teneurs du gaz étudié dans le gaz total, exprimées en pourcentage, mesurées respectivement le jour du prélèvement et lors du prélèvement précédent.
- $P_{\text{salle } (j)}$ et $P_{\text{salle } (j-1)}$, les pressions en Pa mesurées dans la salle, le jour du prélèvement et après le prélèvement précédent.
- $P_0 = 10^5$ Pa, condition normale de pression
- $T_0 = 273,15$ K, condition normale de température

- V_h , le volume du ciel gazeux dans le flacon en m^3
- R, la constante des gaz parfaits
- T, température en Kelvin

II.2.4. Mesure de la concentration en acides gras volatiles (AGV)

Le dosage des concentrations en AGV est réalisé sur la phase aqueuse de la boue (méthode de séparation décrite § II.3.1.1), par CPG. Cette analyse permet de mesurer les concentrations en acétate, propionate, butyrate, iso-butyrate, valérate et iso-valérate, d'un échantillon liquide, grâce à une table d'identification préprogrammée dans le système d'analyse. Une solution d'acide éthyl 2 butyrique à 1g/L, servant d'étalon interne, doit être ajoutée à l'échantillon à analyser (volume à volume).

L'analyse des échantillons s'effectue, sous un gradient de température, par un chromatographe (Varian GC 3900) équipé d'un détecteur à ionisation de flammes. Un passeur automatique complète l'ensemble, permettant l'analyse en série des échantillons. Une seringue prélève automatiquement le liquide et le place dans l'injecteur qui est chauffé à une température de 210°C. Le liquide se volatilise et les produits gazeux de cette volatilisation migrent dans la colonne semi-capillaire FFAP de 15 m de long et de 0,52 mm de diamètre, Phase EC™ 1000. Le four est soumis à un gradient de température de 80°C à 120°C (rampe de 10°C/min). L'injecteur est maintenu à 210°C et le détecteur à 280°C. Le gaz vecteur, l'azote, est maintenu à un débit 6 mL/min. Les pressions en hydrogène et air sont de 50 kPa et 100 kPa, respectivement. L'acquisition des données est réalisée grâce au logiciel Galaxie Work Station de Varian (version 1.9.3.2).

II.3. Dosage des micropolluants organiques

Le dosage des micropolluants organiques est effectué dans les différentes fractions de la boue (particulaire et colloïdale/dissoute) ainsi que sur les échantillons totaux de boue.

Le dosage des HAP et NP, des échantillons totaux et de la phase particulaire, est réalisé au laboratoire par chromatographie liquide à haute performance, HPLC couplée à un détecteur de fluorescence ; le dosage des PCB est réalisé à l'INRA d'Arras par chromatographie gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD) ; le dosage des HAP en phase soluble est réalisé par micro-extraction sur phase solide (SPME) suivi d'une analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) au Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC) de Bordeaux.

II.3.1. Préparation des échantillons

II.3.1.1. Séparation phase particulaire et aqueuse

Une centrifugation à 15 000 g pendant 20 min, suivi d'une filtration à 1,2 µm permet de séparer la phase particulaire de la boue de sa phase aqueuse. La phase aqueuse contient alors les matières colloïdales et dissoutes.

II.3.1.2. Lyophilisation

La lyophilisation est un procédé qui consiste à retirer l'eau d'un produit surgelé par évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide, à très basse pression, l'eau se sublime, c'est-à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux. La vapeur d'eau, quittant le produit, est alors piégée à l'état de glace par congélation à l'aide d'un condenseur, ou piège froid. Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité.

250 millilitres de boues totales ou bien de leur phase particulaire sont donc tout d'abord congelés à -20°C. Grâce au module HetoPowerDry PL 3000 (ThermoElectron Corporation), ces échantillons sont lyophilisés. Les parois du piège à glace sont maintenues à -55°C, le vide est poussé à 1 mbar, et les étagères portant les plateaux sont équipées de résistances chauffantes, de manière à accélérer la sublimation de la glace. Le chauffage est programmé selon des paliers de 2 h à -20°C, -5°C, 5°C, 15°C puis les échantillons sont maintenus à 25°C jusqu'à arrêt de l'appareil. La lyophilisation dure environ 24 h.

II.3.1.3. Broyage

De manière à garantir des échantillons homogènes et obtenir une poudre fine, les échantillons lyophilisés sont broyés. Pour cela, un microbroyeur (Culatti) équipé d'un tamis de 1 mm est utilisé. La vitesse de rotation de la tête de broyage est fixée entre 4000 et 4500 rpm. L'échantillon broyé est récupéré dans un flacon pyrolysé ambré et conservé à température ambiante.

II.3.2. Extraction des micropolluants organiques

L'extraction des HAP/PCB/NP contenus dans des échantillons (de boue totale ou du particulaire de la boue), après lyophilisation et broyage, se fait de manière conjointe. Elle est réalisée par extraction accélérée par solvant avec l'« Accelerated Solvent Extractor » (ASE 200, Dionex). Cet appareil accélère l'extraction des composés organiques en utilisant des solvants à des températures élevées. Une pression est

appliquée à la cellule (contenant l'échantillon) pour maintenir le solvant chauffé à l'état liquide pendant l'extraction. Après chauffage, l'extrait est rincé de la cellule de l'échantillon vers un flacon de récupération.

Dans des cellules comportant un filtre en fibre de verre (Whatman), surmonté de 1 g d'alumine (rétention des composés polaires, Sigma Aldrich) et de 1 g d'hydromatrix (dispersant et asséchant, Varian), 0,5 g d'échantillon sont introduits puis mélangés à l'hydromatrix présent. Enfin, le volume restant est comblé d'hydromatrix.

Le solvant utilisé pour l'extraction est un mélange d'hexane et d'acétone à 50/50 volumique. Une extraction consiste à chauffer la cellule remplie de ce mélange jusqu'à atteindre la température de 120°C (au bout de 6 min), à maintenir cette température et une pression de 100 bars pendant 5 min, puis à purger 60 % du volume de solvant pour le remplacer par du solvant neuf. L'opération est répétée une seconde fois. Deux extractions sont opérées par cellule, et l'extrait est récupéré dans deux flacons séparés. L'évaporation du solvant est réalisée à l'aide du Multivapor Buchi P12 couplé à un vacuum controller V-855. Dans ce Multivapor, les échantillons sont agités, chauffés à 45°C, mis sous vide (500 mbar), et les solvants sont condensés à 4°C. Le séchage complet des extraits est obtenu sous flux d'azote. 2 mL d'acétonitrile sont introduits dans chaque vial de récupération. Après agitation et repos, les deux volumes de 2 mL et 1 mL additionnel d'acétonitrile utilisé pour le rinçage sont rassemblés dans un vial de reprise préalablement taré. Le volume exact de reprise est déterminé par pesée.

Les extraits sont conservés à -20°C.

II.3.3. Mesure de la concentration en hydrocarbures aromatiques polycycliques

II.3.3.1. Sur la boue totale et la phase particulière

Les HAP sont quantifiés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette chaîne analytique est composée d'un passeur d'échantillons (Waters 717 plus Autosampler), d'un système de pompes péristaltiques (Waters 600 Controller) et d'un détecteur fluorimétrique (Waters 2475).

La colonne greffée en C18 (Bakerbond™ PAH 16-Plus) est maintenue à température constante de 25°C, à l'aide d'un four à effet Pelletier (CIL Cluzeau). Après l'injection de 20 µL d'échantillon, le système de pompes permet de générer une première phase isocratique à 0,25 mL/min de mélange acétonitrile/eau (60/40 v/v) pendant 30 min, puis un gradient jusqu'à atteindre une élution d'acétonitrile à 100 % au bout de 35 min, et le débit est finalement augmenté à 0,5 mL/min pour la phase de rinçage sous acétonitrile/eau (60/40 v/v). Le système de détection optimisé au laboratoire est

programmé de façon à quantifier chaque HAP à son couple longueur d'excitation (λ_{ex}) / longueur d'onde d'émission (λ_{em}) optimal (Tableau II-1).

Tableau II-1: Temps de rétention (t_R en min) des HAP par HPLC et couples de longueurs d'onde d'excitation / émission (nm) utilisés pour leur détection par fluorimétrie

HAP	Flu	Phe	Ant	Fluora	Pyr	BaA	Chr	BbF	BkF	BaP	DBA	BghiP	Ind
t_R	22	26	31	36	39	49	51	57	60	63	67	69	71
λ_{ex}	266	250	250	280	260	280	268	234	270	270	300	300	300
λ_{em}	312	370	400	430	410	430	384	420	400	400	407	407	500

L'étalonnage est réalisé par six niveaux de standard (10 à 1 000 $\mu\text{g/L}$) obtenus à partir de la dilution d'une solution mère PAH Mix 9 (CIL Cluzeau) à 10 mg/L. Après chaque série d'environ 10 échantillons, un standard est injecté de façon à vérifier la stabilité du signal au fil des injections et à corriger les données.

II.3.3.2. Sur la phase aqueuse

Le dosage des HAP est aussi réalisé dans la phase aqueuse. Ce dosage permet de dissocier les HAP libres de ceux présents dans la phase aqueuse. La concentration dans la phase colloïdale est donc déduite de ces deux mesures par calcul. Le dosage des HAP dans la phase aqueuse est réalisé par SPME suivi d'une analyse en GC-MS sous la direction d'Hélène Budzinski au LPTC de Bordeaux.

Les analyses SPME sont réalisées sur 9 mL d'échantillon de phase aqueuse de boue, avec des fibres Supelco (Bellefonte) recouvertes de polydiméthylsiloxane (PDMS) et polydiméthylsiloxane-divinylbenzène (PDMS-DVB) (Figure II-4). Après immersion de la fibre dans l'échantillon, celle-ci est introduite dans l'injecteur de la GC-MS où les composés sont alors immédiatement désorbés. Les analyses sont effectuées automatiquement avec un CombiPAL (CTC Analytics).

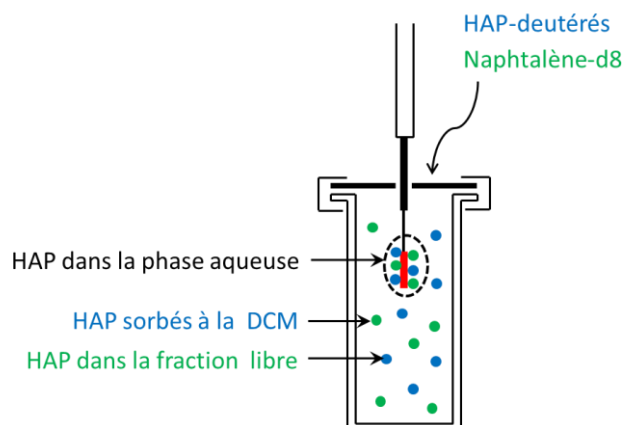


Figure II-4: Système SPME (CEA-Barcia, 2012)

La quantification des HAP se fait grâce à un GC (Agilent 6890) équipé d'un détecteur sélectif de masse (modèle 5972) avec une énergie d'ionisation de 70eV. La colonne

utilisée est une HP-5MS ((5%-phényl)-méthylpolysiloxane, 30 m x 0,25 mm id, film de 0,25 µm; Agilent Technologies). L'injection d'échantillons SPME est réalisée en mode pulse splitless (pulse d'une minute à 30 psi, puis application d'un débit de purge 55 mL/min de pendant 2 min et enfin l'économiseur de gaz est fixé à un flux de 20 mL/min pendant 15 minutes) et la température d'entrée est de 250°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1,3 mL/min et une vitesse linéaire de 42 cm/s. La température de la colonne est maintenue pendant 2 min à 60°C, puis différents paliers de température sont atteints. Le premier palier est à 150°C (rampe de 20°C par minute), le second à 250°C à (rampe de 15°C par minute) et enfin le troisième est à 310°C (rampe de 10°C par minute) et cette température finale est enfin maintenue pendant 3 min. La GC-MS est utilisée suivant le mode d'acquisition SIM (Selected Mode Acquisition).

La mesure des concentrations en HAP se fait en utilisant les correspondants HAP-deutérés et le naphthalène-d8 comme étalon interne de la quantité de HAP dans la phase aqueuse et sous état libre, respectivement.

A partir d'échantillons d'eau milliQ et de surnageant de boue, dopés à des concentrations connus en HAP et en leur correspondants deutérés, le facteur de réponse K_i de chaque HAP est calculé. Pour la détermination des K_i de la fraction libre, le naphthalène-d8 a été choisi comme étalon interne (Hawthorne et al. 2005), car sa réponse est la même avec ou sans matière dissoute et colloïdale (DCM).

La méthode de calcul des concentrations en HAP dans la phase aqueuse et la fraction libre est validée en déterminant les valeurs de coefficients de réponse (K_i) et les concentrations des pseudo-inconnus (C_i) dans de l'eau milliQ et dans des échantillons phase aqueuse (DCM) de boue non dopée en utilisant les équations suivantes :

$$m_d = A_d * K_d$$

$$m_i = A_i * K_i$$

$$K_i = K_d / K = (A_i / A_d) * (m_d / m_i)$$

- m_d = quantité du composé (deutééré ou naphthalène-d8) étalon interne rajouté dans l'échantillon.
- m_i = quantité du composé (i) présent dans l'échantillon.
- A_d = aire du pic chromatographique correspondant au composé (deutééré ou naphthalène-d8) étalon interne
- A_i = aire du pic chromatographique correspondant au composé (i) à doser
- $(K_i / K_d) = K_i$ coefficient de réponse du composé (i) quantifié par rapport au composé (deutééré ou naphthalène-d8).

Six échantillons (trois d'eau milliQ et 3 de DCM) de 9 mL sont dopés à des concentrations connues des 13 HAP étudiés, avec leurs correspondants HAP-deutééré. Les échantillons sont analysés par SPME-GC-MS, et les coefficients de réponse sont

déterminés pour l'eau milliQ et pour les échantillons de DCM. Puis, les concentrations des pseudo-inconnus des échantillons DCM sont calculés en utilisant les valeurs de K_i obtenues dans de l'eau milliQ, ainsi il est possible de connaître la capacité d'interférence de la matrice sur la quantification des HAP en phase aqueuse. Si les valeurs de C_i pour chaque HAP sont proches de 100%, la méthodologie est validée.

Au vu des résultats présentés dans le tableau II-2, la méthode de calcul n'a pas d'influence sur la concentration totale de la phase aqueuse, par contre, cette méthode a un impact sur le calcul des concentrations dans la phase libre.

Tableau II-2: Rendements de quantification des HAP en SPME obtenus suivant les différentes méthodes de calcul

Composés	Rendements de quantification en %					
	Phase aqueuse			Phase libre		
	aqu/aqu	DCM/DCM	DCM/aqu	aqu/aqu	DCM/DCM	DCM/aqu
Phénanthrène	103	100	118	102	100	110
Anthracène	106	102	112	108	102	128
Fluorène	106	101	121	107	101	125
Fluoranthène	103	101	101	87	101	66
Pyrène	99	99	98	84	99	58
Benzo(A)Anthracène	104	101	94	80	101	28
Chrysène	103	102	98	78	102	25
Benzo(b)Fluoranthène	105	100	85	85	100	9
Benzo(k)Fluoranthène	104	102	96	88	102	9
Benzo(A)Pyrène	104	111	100	89	111	8
Indéno(1,2,3,c,d)Pyrène	111	93	103	110	93	2
Dibenzo(a,h)Anthracène	109	115	119	105	115	3
Benzo(g,h,i)perylène	108	79	104	111	79	3

aqu/aqu : rendement calculé dans l'eau milliQ dopée par rapport à l'ensemble des composés deutérés (ou au naphthalène d8 pour la phase libre), avec les K_i calculé dans l'eau milliQ

DCM/DCM : rendement calculé dans le surnageant dopé par rapport à l'ensemble des composés deutérés (ou au naphthalène-d8 pour la phase libre), avec les K_i calculé dans le surnageant.

DCM/aqu : rendement calculé dans le surnageant dopé par rapport à l'ensemble des composés deutérés (ou au naphthalène-d8 pour la phase libre), avec les K_i calculés dans l'eau milliQ

Calculer les concentrations dans le surnageant à partir des K_i obtenus sur l'eau milliQ entraine des erreurs d'autant plus grandes que les molécules sont hydrophobes. Nous avons donc choisi de calculer les concentrations dans nos échantillons en utilisant les K_i obtenus dans le surnageant de boue.

Les étalons utilisés pour mesurer la concentration de HAP, ont donc été réalisés avec les surnageants d'une boue qui ont été dopés. Les K_i sont mesurés au début, régulièrement entre les échantillons et à la fin de chaque séquence SPME-GC-MS afin de vérifier qu'ils n'évoluent pas au cours de l'analyse. Dans chaque 9 mL d'échantillon 50µL

de la solution d'étalon interne (mélange de chaque HAP deutéré ou solution de naphthalène-d8 à une concentration de 200ng/g solvant) est ajouté.

II.3.4. Mesure de la concentration en nonylphénol

II.3.4.1. Sur la boue totale et la phase particulaire

Le NP est analysé selon la méthode mise au point par Ahel et al. (2000). Le dispositif de dosage du NP par HPLC est composé d'un passeur d'échantillon ASI 100 (Dionex), d'un système de pompe P580 (Dionex) et d'un détecteur fluorimétrique RF2000 (Dionex).

La colonne LiChroCART® Purospher® STAR NH2 est maintenue à 30°C à l'aide d'un four (CIL Cluzeau). L'éluant utilisé est un mélange hexane/isopropanol (98,5/1,5 v/v), ce qui nécessite un transfert des extraits (obtenus dans de l'acétonitrile) dans de l'hexane, par une étape d'évaporation de 100 µL d'extrait et reprise dans un volume adéquat d'hexane. L'élution s'effectue en mode isocratique à 2 mL/min, et le nonylphénol (t_R : 13 min) est détecté au couple $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 228/305 nm.

A partir d'une solution standard commerciale à 10 mg/L (CIL Cluzeau), quatre niveaux de concentrations sont préparés (0,5, 1, 2 et 4 mg/L). Le volume injecté est de 20 µL. Une série d'injection de ces quatre niveaux est intercalée entre chaque série de 10 échantillons.

II.3.5. Mesure de la concentration en polychlorobiphényles

II.3.5.1. Sur la boue totale

Les extraits obtenus à l'ASE dans l'ACN sont envoyés à l'INRA d'Arras pour dosage de la concentration en PCB. Là, après avoir été repris dans du dichlorométhane (DCMe) et avoir subi une étape de purification, les concentrations en PCB sont mesurées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD).

II.4. Etude des communautés microbiennes

Dans un premier temps, une vision globale de l'influence des communautés microbiennes est obtenue par amplification PCR de la région V3 de la sous unité ribosomale de l'ADN 16S, suivie d'une méthode d'empreinte moléculaire par CE-SSCP. Cette première analyse permet d'obtenir la structure, la diversité et la dynamique des populations bactériennes et archées ainsi que l'abondance relative des espèces présentes. Cette analyse est complétée par une PCR quantitative permettant d'estimer les proportions de bactéries et d'archées et de suivre leur évolution.

Dans un second temps, une approche plus fonctionnelle est employée en ciblant des gènes fonctionnels potentiellement impliqués dans la dégradation des micropolluants organiques. Un couple d'amorces a permis de cibler un gène *bssA* codant pour la benzylsuccinate synthase impliquée dans l'ouverture des cycles aromatiques. Un autre couple d'amorces a permis de cibler le gène *rdh* impliqué dans les processus de déchloration notamment chez *Dehalococcoides*.

II.4.1. Préparation et conservation des échantillons

Un millilitre de boue est prélevé puis centrifugé à 13400 rpm pendant 10 min et le surnageant est éliminé. Le culot est suspendu dans 500 µL d'un mélange composé d'1 mL de tampon guanidine thiocyanate 4 M Tris-Cl pH 7,5 0,1 M et de 300 µL de N-lauroyl sarcosine 10 % (N-LS).

II.4.2. Extraction de l'ADN

Le but de l'extraction d'ADN est d'isoler l'ADN chromosomique des microorganismes présents dans l'échantillon en appliquant différentes méthodes de lyses (thermique, chimique et mécanique) sans le dénaturer. Cette procédure se divise en 4 étapes : lyses des cellules, lavage du support permettant la lyse des cellules, élimination des impuretés et précipitation de l'ADN, et enfin purification de l'ADN.

II.4.2.1. La lyse cellulaire

A l'échantillon encore congelé sont ajoutés 500 µL de LS 5%-tampon phosphate pH 8 0.1 M. Après 1 h d'incubation à 70°C, l'échantillon est placé dans de la glace. 500 µL de billes de zirconium stériles de 0,1 mm de diamètre sont ajoutées avant de soumettre l'échantillon à une agitation de 10 min à vitesse maximale par un vibrobroyeur. 15 mg de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) sont ajoutés puis l'échantillon est vortexé 30 s avant d'être centrifugé à 13400 rpm pendant 3 min. Le surnageant résultant de cette centrifugation est récupéré dans un tube de 2 mL.

II.4.2.2. Lavage

Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 500 µL de TENP (Tris-Cl pH8 50 mM, EDTA pH8 20 mM, NaCl 100 mM, PVPP polyvinylpolypyrrolidone 1%) avant d'être centrifugé à 13400 rpm pendant 3 min. Le surnageant est ensuite récupéré et additionné dans le tube de 2 mL à celui précédemment obtenu.

Cette étape est répétée sur le culot encore deux fois, puis une dernière centrifugation à 13400 rpm de 3 min est effectuée sur le tube contenant les surnageants pour éliminer les matières en suspensions restantes.

II.4.2.3. Elimination des impuretés

Le surnageant est réparti dans 2 tubes de 2 mL. Un volume d'isopropanol est ajouté dans chaque tube avant de l'agiter doucement en le balançant afin d'obtenir une pelote d'ADN puis de le laisser 10 min à température ambiante. L'échantillon est ensuite centrifugé 13400 rpm pendant 15 min et les 2 culots sont récupérés dans 100 µL d'eau et réunis. Après avoir ajouté 20 µL de RNase à 1 mg/mL, l'échantillon est vortexé 15 s puis incubé 10 min à 37°C.

II.4.2.4. Purification

Pour cette étape, le matériel du kit commercial kit QIAamp DNA Mini Kit est utilisé.

Un volume de 200 µL de tampon AL est ajouté à l'échantillon qui est ensuite vortexé 15 s puis incubé 10 min à 70°C.

Après incubation, 200 µL d'éthanol absolu pour biologie moléculaire sont ajoutés à l'échantillon qui est à nouveau vortexé 15 s. Le contenu du tube est alors transvasé sur la colonne QIAamp avant une centrifugation à 13400 rpm d'1min. L'ADN se fixe alors sur la colonne.

Le filtrat est éliminé et 500 µL de tampon AW1 sont ajoutés avant une centrifugation à 13400 rpm d'1 min.

L'étape ci-dessus est répétée avec le tampon AW2. Après élimination du filtrat, une nouvelle centrifugation à 13400 rpm d'1 min est appliquée pour éliminer toute contamination avec le tampon.

La colonne est ensuite transférée dans un tube de 1,5 mL et 50 µL d'eau ppi sont ajoutés puis l'échantillon est laissé à incuber 5 min à température ambiante avant d'être centrifugé une dernière fois à 13400 rpm pendant 1 min.

Dans un premier temps, avant congélation et conservation de l'extrait obtenu, le bon fonctionnement de l'extraction est vérifié par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,7 % contenant du bromure d'éthidium (BET). Le résultat de la migration est visualisé par fluorescence UV.

Dans un deuxième temps, dans un souci de limiter l'exposition des agents à des produits CMR, l'emploi du BET a été supprimé du laboratoire. La pureté et la quantité d'ADN extrait sont dès lors vérifiées par mesure des absorbances à 260 et 280 nm, à l'aide d'un spectromètre Infinite M 200 Nanoquant (Tecan). Le ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} permet de vérifier la pureté de l'ADN et doit être compris entre 1,8 et 2.

II.4.3. Amplification de l'ADN par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant l'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques, d'une polymérase et des désoxyribonucléotides (dNTP). Chaque cycle de température permet une dénaturation du brin d'ADN devenant monocaténaire, puis une hybridation des amorces et fixation de la polymérase, et enfin une élongation (copie) du brin ciblé par cette dernière.

II.4.3.1. Amplification de la région V3 de l'ADNr 16S

Dans le but d'analyser la structure des communautés bactérienne et archées, la région V3 de l'ADNr 16S est amplifiée par PCR. Les bactéries sont ciblées spécifiquement par le couple d'amorce W49 (amorce spécifique des bactéries) et W104 (amorce universelle). Les archées quant à elles sont ciblées spécifiquement par les amorces W274 et W275 (Tableau II-3). Les amorces W104 et W275 sont marquées par un fluorochrome pour permettre la détection, par le laser de la CE-SSCP, du fragment amplifié.

Tableau II-3: Amorces utilisées lors de l'étude des différentes communautés microbiennes

Amorce	PCR / PCR-Q	Séquence (5' – 3')	Fluorochrome	Référence
W49F	PCR	AGGTCCAGACTCCTACGGG		(Zumstein et al., 2000)
W104R	PCR	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	3' - 6 - FAM	(Zumstein et al., 2000)
W274F	PCR	CCCTACGGGGCGCAGCAG		(Braun et al., 2011)
W275R	PCR	TTACCGCGGCGGCTG	3' - 6 - FAM	(Braun et al., 2011)
W243F	PCR / PCR-Q	AARTGGCAAYGACGACGA		(Barret, 2009)
W244R	PCR / PCR-Q	TTCTGGTTTTCTGCACTTT		(Barret, 2009)
rdh4F	PCR / PCR-Q	GATGATACGATTTATGGCAATC		(Park et al., 2011)
rdh4R	PCR / PCR-Q	CCRAACGGGAARTCTTCTTC		(Park et al., 2011)
BAC338F	PCR-Q	ACTCCTACGGGAGGCAG		(Yu et al., 2005)
BAC805R	PCR-Q	GACTACCAGGGTATCTAATCC		(Yu et al., 2005)
BAC16F	PCR-Q	TGCCAGCAGCCGCGGTAATAC	5'-Yakima yellow 3'-TAMRA	(Yu et al., 2005)
ARC787F	PCR-Q	ATTAGATACCCSBGTAGTCC		(Yu et al., 2005)
ARC1059R	PCR-Q	GCCATGCACCWCCTCT		(Yu et al., 2005)
ARC915F	PCR-Q	AGGAATTGGCGGGGAGCAC	5'-6-FAM 3'-TAMRA	(Yu et al., 2005)

L'amplification des séquences bactériennes est réalisée dans 50 µL de mélange PCR contenant 5 µL de tampon 10x *Pfu* Turbo, 200 nM de dNTP, 400 nM de chaque amorce, 1,25 U d'ADN polymérase *Pfu* Turbo (Stratagene, La Jolla, CA) et 1 µL d'ADN (dilué si nécessaire), complétés avec de l'eau ppi pour obtenir le volume réactionnel souhaité. Les cycles PCR sont réalisés dans un Mastercycler Eppgradient S (Eppendorf). Le programme de température appliqué est de 94°C pendant 2 min (dénaturation initiale), 25 cycles de 30 s à 94°C (dénaturation), 30 s à 61°C (hybridation), et 30 s à 72°C (élongation), suivis finalement de 10 min d'élongation à 72°C.

L'amplification des séquences archéennes est réalisée dans 25 µL de mélange PCR contenant 2,5 µL de tampon 10x *Pfu* Turbo, 200 nM de dNTP, 500 nM de chaque amorce,

0,625 U d'ADN polymérase *Pfu* Turbo (Stratagene, La Jolla, CA), 1 µL d'ADN (dilué si nécessaire), complétés avec de l'eau ppi pour obtenir le volume réactionnel souhaité. Les cycles PCR sont réalisés dans un Mastercycler Eppgradient S (Eppendorf). Le programme de température appliqué est de 94°C pendant 2 min (dénaturation initiale), 30 cycles de 30 s à 94°C (dénaturation), 30 s à 65°C (hybridation), et 30 s à 72°C (élongation), suivis finalement de 10 min d'élongation à 72°C.

II.4.3.2. Amplification du gène de la benzylsuccinate synthase

Pour amplifier les versions du gène *bssA* contenues dans les extraits d'ADN, des amorces spécifique W243 et W244 (Tableau II-3), dessinées au laboratoire (Barret, 2009), sont utilisées. L'amplification des versions du gène *bssA* présent dans les microorganismes de nos échantillons est réalisée dans 50 µL de mélange PCR contenant 5 µL de tampon 10x *Pfu* Turbo, 200 nM de dNTP, 400 nM de chaque amorce, 1,25 U d'ADN polymérase *Pfu* Turbo (Stratagene, La Jolla, CA) et 1 µL d'ADN (dilué si nécessaire), complétés avec de l'eau ppi pour obtenir le volume réactionnel souhaité. Les cycles PCR sont réalisés dans un Mastercycler Eppgradient S (Eppendorf). Le programme de température appliqué est de 94°C pendant 2 min (dénaturation initiale), 30 cycles de 30 s à 94°C (dénaturation), 30 s à 51°C (hybridation), et 30 s à 72°C (élongation), suivis finalement de 10 min d'élongation à 72°C. Le témoin positif utilisé pour cette amplification est de l'ADN d'*Azoarcus sp.* CIB.

II.4.3.3. Amplification de la communauté haloinspirante

Pour amplifier le gène *rdh* contenu dans les extraits d'ADN, des amorces rdh4F et rdh4R (Tableau II-3), dessinées par Park et al. (2010) sont utilisées. L'amplification est réalisée dans 50 µL de mélange PCR dont les caractéristiques sont identiques à celles utilisées pour l'amplification du gène *bssA*. Les cycles PCR sont réalisés dans un Mastercycler Eppgradient S (Eppendorf). Le programme de température appliqué est de 94°C pendant 5 min (dénaturation initiale), 35 cycles de 20 s à 94°C (dénaturation), 60 s à 52°C (hybridation), et 60 s à 72°C (élongation), suivis finalement de 7 min d'élongation à 72°C (Park et al., 2011). Le témoin positif employé ici est de l'ADN provenant d'un enrichissement de *Dehalococcoides ethenogenes 195*, fourni par le Pr Max M. Häggblom (Rutgers University, USA).

II.4.3.4. Vérification de l'efficacité d'amplification

Après avoir stoppé toutes les réactions PCR en maintenant les échantillons à 4°C, l'efficacité des différentes PCR est vérifiée par électrophorèse. L'électrophorèse permet de séparer les brins d'ADN en fonction de leur poids moléculaire. Les acides nucléiques, chargés négativement, migrent électrophorétiquement à travers la matrice d'un gel sous l'effet d'un champ électrique. Plus le pourcentage d'agarose du gel est important, plus le

maillage est serré. Plus le poids moléculaire des molécules est faible, plus elles migrent rapidement.

Dans un premier temps, l'efficacité d'amplification PCR est vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 % contenant du bromure d'éthidium (BET). Le résultat de la migration est visualisé par fluorescence UV.

Dans un deuxième temps, toujours dans le but de limiter l'utilisation de produit CMR comme le BET, l'efficacité de l'amplification par PCR est vérifiée à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent). Cet appareil permet une analyse des produits PCR par électrophorèse sur des puces en microfluidique. L'ajout d'un marqueur fluorescent permet de détecter les fragments d'ADN par fluorescence aux UV induite par un laser.

II.4.4. La CE-SSCP (Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism)

La CE-SSCP est une technique d'empreinte moléculaire qui permet de visualiser rapidement une image représentative de la communauté microbienne présente dans un échantillon. Cette méthode sépare les fragments D'ADN simples brins de même taille mais de séquence nucléotidique différente. Les fragments d'ADN amplifiés à l'aide d'amorces marquée lors de la PCR, sont préalablement dénaturés. Chaque fragment adopte ensuite une structure secondaire spécifique de sa séquence qui lui confère une vitesse de migration précise. Lors de la migration le brin marqué est détecté par un laser et visualisé sous forme de pic. Chaque espèce est représentée par un pic. La surface des pics est proportionnelle à la quantité d'ADN détecté et correspond donc à l'abondance relative d'une espèce au sein de l'écosystème (Delbès et al., 2001).

1 μ L de chaque produit PCR amplifié à l'aide du couple d'amorces W49/W104 (pour les bactéries) ou W274/W275 (pour les archées), marqué en 5' (fluorophore FAM) est dilué dans de l'eau ppi, de manière à ce que l'intensité de fluorescence émise par l'échantillon ne dépasse pas la limite de détection du laser.

1 μ L de chacune de ces dilutions est ensuite déposé dans une plaque 96 puits auquel est ajouté 18,8 μ L de formamide et 0,2 μ L de standard interne GeneScan ROX (Applied Biosystems). Ce dernier permet d'attribuer à chaque fragment une position de migration spécifique de sa structure secondaire, donc de sa séquence. Les échantillons sont ensuite dénaturés par chauffage (5 min à 95 °C), puis refroidis rapidement (10 min dans de la glace).

L'électrophorèse est réalisée en séquenceur par l'ABI Prism 3130 genetic analyser (Applied Biosystems). Les fragments d'ADNr 16S migrent dans un capillaire (47cm \times 50 μ m) rempli à 5,6% d'un polymère d'analyse de conformation (GeneScan polymer, Applied Biosystems). Chaque amorce marquée par un fluorophore est détectée par le laser de l'appareil, qui transcrit le signal sous la forme d'un pic où chaque pic

correspond à un fragment d'ADN. La migration de chaque échantillon est réalisée à 32°C pendant 30min sous une intensité de courant de 12 kV.

Chaque profil CE-SSCP est aligné avec un standard interne ROX pour corriger toute modification de la mobilité électrophorétique entre les différents passages. La somme des surfaces des pics a été normalisée avant l'analyse statistique. La complexité des communautés microbiennes a été estimée en utilisant l'indice de Simpson (D) à partir des profils (Simpson 1949). Cet indice est calculé à partir du nombre de pic et de leur abondance relative (air sous les pics) grâce à la formule suivante :

$$D = -\ln(\sum(\text{aire des pics})^2).$$

Ces étapes de traitement des profils ont été réalisées à l'aide du package StatFingerprints (Michelland et al., 2009) sur la version 2.11.1 de R (R. Development Core Team, 2010).

II.4.5. Quantification des communautés par PCR quantitative

La PCR quantitative permet de suivre en continu (« en temps réel ») le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par le produit PCR formé. La quantification se fait en comparant un échantillon de référence à un échantillon à tester. En utilisant comme référence un échantillon où le nombre de molécule est connu, une quantification absolue de l'échantillon testé pourra être obtenue en nombre de copies.

La réaction de PCR quantitative (Q-PCR) de quantification des bactéries et des archées est réalisée dans des plaques RT-PCR 96 puits (Eppendorf) par un Mastercycler[®] ep *realplex²S* (Eppendorf). L'amplification est réalisée pour les bactéries dans 25 µL de mélange PCR contenant 12,5 µL d'Express qPCR Supermix pré-mélangé à du ROX (Invitrogen), 5 µL d'ADN dilué, 100 nM de l'amorce BAC338F, 250 nM de l'amorce BAC805R, et 50 nM de sonde TaqMan, complétés avec de l'eau pure pour obtenir le volume réactionnel souhaité. Pour les archées le même mélange est réalisé avec cette fois-ci 200nM de chaque amorce (ARC787F et ARC1059R). Le programme de température appliqué est de 95°C pendant 2 min, suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C, 1 min à 60°C. Pour chaque essai, une courbe de référence est générée en utilisant 10 degrés de dilution d'un produit PCR provenant de clones connus. Les clones DF10 et LC103 sont utilisés comme standard de référence pour les bactéries et les archées, respectivement. Pour chaque échantillon, trois dilutions sont testées.

II.4.6. Pyroséquençage

Cette méthode consiste à séquencer un ADN monobrin par synthèse du brin complémentaire, base par base, en détectant à chaque étape le nucléotide qui a été ajouté.

Des échantillons d'ADN totaux ont été envoyés à la société Molecular Research Laboratory (Texas, USA). Le séquençage des régions V4-V5 de l'ADNr 16S des bactéries et des archées a été réalisé sur GS-FLX 454 Titanium de Roche et les analyses bioinformatiques standard (contrôles qualité du process, qualité des séquences, groupement en OTU) ont été réalisées par cette même société. Les noms des espèces indiqués ce travail sont ceux de l'espèce cultivée la plus proche.

II.5. Évaluation de l'activité « perturbateurs endocriniens » des boues

L'activité « perturbateurs endocriniens » est évaluée grâce à des bioessais *in vitro* sur différentes lignées cellulaires. Ces expériences sont réalisées sous la direction de Selim Aït-Aïssa à l'unité « Écotoxicologie *in vitro* et *in vivo* » de l'INERIS à Verneuil-en-Halatte. Les lignées cellulaires utilisées sont la lignée MELN, la lignée MAD-kb2 et la lignée PLHC1 qui permettent d'évaluer les activités œstrogénique, androgénique et /ou glucocorticoïde et enfin *dioxin-like* et *HAP-like*, respectivement.

Les tests cellulaires sont réalisés sur des extraits d'échantillon provenant de boue totale, de phase particulaire et aqueuse. Les extraits sur la boue totale et le particulaire sont obtenus à partir des échantillons lyophilisés. L'extraction est réalisée à l'ASE. Le solvant utilisé pour l'extraction est un mélange volumique de dichlorométhane et de méthanol à 50/50 et les extraits sont repris dans du méthanol. Les échantillons de surnageant subissent une extraction liquide-liquide avec 100% de dichlorométhane. Avant d'effectuer les tests cellulaires, les échantillons sont repris dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Le mode opératoire des bioessais est divisé en trois grandes étapes, l'exposition des cellules à l'échantillon à analyser, la mesure de l'intensité de luminescence ou de fluorescence induite par l'activation des récepteurs et enfin le traitement des résultats permettant de calculer l'activité de l'échantillon testé (Figure II-5).

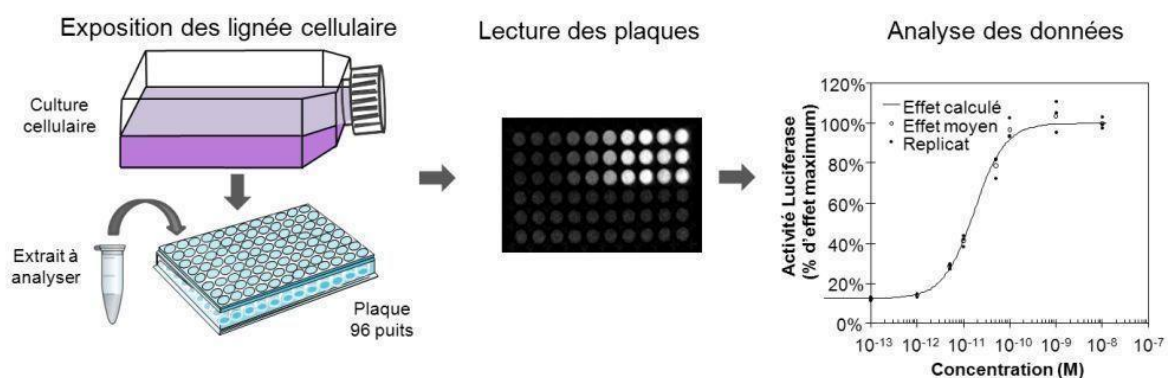


Figure II-5: Analyses en bioessais *in vitro*

II.5.1. Génération de lignées cellulaires

II.5.1.1. La lignée cellulaire MELN

La lignée cellulaire MELN, fournie par Patrick Balaguer de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (INSERM U896), dérive d'une lignée cellulaire humaine de cancer du sein (lignée MCF-7) qui exprime de manière endogène le récepteur aux œstrogènes ER α . Cette lignée a été produite en transfectant de façon stable le gène codant pour la luciférase placé sous le contrôle d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) et du promoteur du gène de la β -Globine (Balaguer et al. 1999).

II.5.1.2. La lignée cellulaire MDA-kb2

La lignée cellulaire MDA-kb2, fournie par l'*American Tissue Cell Collection* (ATCC, N° CRL2713), dérive d'une lignée de cellules épithéliales humaines de cancer du sein (lignée MDA-MB-453) qui exprime de manière endogène le récepteur des androgènes (AR). Elle exprime également le récepteur des glucocorticoïdes (GR) alors que les récepteurs de la progestérone (PR) et des œstrogènes (ER) ne sont pas ou peu présents. Cette lignée a été établie en transfectant de façon stable le gène de la luciférase, placé sous le contrôle transcriptionnel du promoteur viral MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) (Wilson et al., 2002). Ce promoteur est activé par les récepteurs AR, GR et PR activés.

II.5.1.3. La lignée cellulaire PLHC-1

La lignée cellulaire PLHC-1 utilisée dans cette étude a été obtenue à partir d'un hépatome de vairon tropical *Poeceliopsis lucida* induit par le diméthylbenzoanthracène (Ryan and Hightower, 1994). Cette lignée présente l'intérêt d'avoir conservé certaines capacités métaboliques hépatiques et exprime notamment un fort taux de récepteurs AhR.

II.5.2. Exposition des cellules aux échantillons à analyser

Deux jours avant l'exposition aux échantillons, les cellules sontensemencées dans des plaques de culture à 96 puits blanches (MELN et MDA-kb2) et transparentes (PLHC-1) à une concentration de 10^3 cellules/ μ L de milieu de culture. Pour les activités hormonales, du milieu de culture sans rouge phénol complétement par du sérum préalablement déstéroïdé (par prétraitement sur dextran et charbon actif) est utilisé afin de minimiser l'interférence du signal basal avec les stéroïdes apportés par le milieu nutritif et augmenter ainsi la sensibilité de détection du test.

Afin de tester l'activité d'extraits d'échantillon à des concentrations X_i , un volume de chaque extrait est séché puis repris par du diméthylsulfoxyde (DMSO). Cette solution à

200X₁ est utilisée pour préparer, par dilutions successives, une gamme de solutions dont les concentrations sont : 200X₂ (X₂ = X₁/3), 200X₃ (X₃ = X₁/10), 200X₄ (X₄ = X₃/10),....etc. 3 µL de chacune de ces solutions est ensuite dilué dans 200 µL du milieu de culture blanc pour obtenir une concentration de 3X_i. 50 µL de chacune des solutions ainsi réalisées sont introduits dans les puits contenant les cellules dans 100 µL de milieu. La concentration finale en échantillon dans chaque puits est de X_i. Dans ces conditions, le pourcentage en solvant est de 0,5 %. A cette concentration en solvant, les tests n'ont montré aucune altération de la viabilité cellulaire ou problème d'expression non spécifique de la luciférase ou de l'EROD. Les cellules sont ensuite incubées avec les extraits de boue, phase particulaire ou phase aqueuse pendant 16 heures (MELN et MDA-kb2) ; pour les cellules PLHC1, deux durées sont testées, 4h (activité *HAP-like*) et 20 heures (activité *dioxin-like*).

II.5.3. Lecture des plaques

II.5.3.1. Plaques MELN et MDA-kb2

A la fin de l'incubation, le milieu contenant les échantillons à tester est remplacé par 50 µL du milieu de culture blanc contenant la luciférine (0,3 mM). L'activation des différents récepteurs par les ligands contenus dans les extraits induit la synthèse de luciférase qui transforme la luciférine en oxyluciférine avec production de lumière. Le signal luminescent est stable au bout de 5 min. Les plaques de 96 puits sont ensuite placées dans un luminomètre lecteur de plaque (*Microbeta Wallac Luminometer*) et la luminescence est mesurée à une vitesse de 2 s/puits. Les résultats bruts sont exprimés en unité relative de luminescence (*RLU: Relative Luminescence Unit*) puis convertis en pourcentage d'activité luciférase. La valeur de 100 % correspond à l'activité induite par le ligand de référence à une concentration saturante.

II.5.3.2. Plaques PLHC-1

A la fin de l'incubation, le milieu de culture est remplacé par 100 µL de milieu sans rouge phénol contenant la 7-ERF à la concentration de 2 µM. Juste après le remplissage de tous les puits par la 7-ERF, la formation de la résorufine est mesurée dans les cellules vivantes, toutes les 30 s pendant au moins 20 min, à l'aide d'un spectrofluorimètre lecteur de plaque (Victor, Perkin Elmer, France). La longueur d'onde d'excitation utilisée est de 530 nm pour une longueur d'onde d'émission de 590 nm. Les résultats bruts enregistrés sont en unité de fluorescence par minute. Ces résultats sont ensuite convertis en pourcentages relatifs de l'activité EROD maximale induite par un ligand de référence (BaP ou TCDD) à une concentration saturante.

II.5.4. Analyses des données *in vitro*

L'activation des récepteurs par les extraits de boue (totale, phase particulaire et phase aqueuse) est exprimée en pourcentage de l'activation maximum induite par le ligand de référence à concentration saturante. Les ligands de référence de chaque test et leurs concentrations effectives sont représentées dans le Tableau II-4.

Tableau II-4: Ligands de référence et concentrations (en nM) effectives (EC50) et saturantes (témoin positif dans le bioessai).

Récepteur	Lignée cellulaire	Ligand de référence	EC ₅₀	EC _{saturante}
ER	MELN	17β-E2	0,018	10
AR	MDA-kb2	DHT	0,1	10
AhR-4h	PLHC-1	BaP	4	100
AhR-24h	PLHC-1	TCDD	0,1	1

Des courbes dose-réponse sont établies pour chaque échantillon et analysées à l'aide d'une "macro" Excel Regtox 7.5 développée par Vindimian et al. (1983) librement disponible sur le site http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html. Cette macro, basée sur le modèle de Hill, permet de déterminer la concentration en échantillon pour laquelle 20, 25 ou 50% de l'activation maximale est obtenue (EC₂₀, EC₂₅ ou EC₅₀, EC : *effective concentration*). Ainsi, en comparant les valeurs des EC₂₀ du ligand de référence à celles de l'échantillon analysé, on détermine l'activité de l'échantillon exprimée en masse d'équivalent de ligand de référence par masse d'échantillon (Ref-EQ). En théorie, le calcul de l'équivalent implique que les courbes dose-réponse aient le même minimum, le même maximum et la même pente, ce qui est rarement le cas. Un éloignement du modèle de référence est fréquemment constaté avec l'augmentation de la concentration, lié notamment à des interférents et des effets de mélange. Utiliser l'EC₂₀ permet de se placer dans les conditions les plus proches possible du modèle de référence.

L'activité toxique-équivalent (TEQ) de l'échantillon testé est donnée par la formule :

$$\text{TEQ} = \text{Ref-EQ} = \text{EC}_{20} \text{ REF} / \text{EC}_{20} \text{ échantillon}$$

avec Ref, le ligand de référence du test.

II.6. Etude de la dégradation du phénanthrène par isotopie au carbone 13

II.6.1. Maintien des conditions anaérobies et automatisation du dispositif

A partir de deux des triplicats des réacteurs inoculés par les microorganismes extraits de la boue, un réacteur semi continu de 800 mL est démarré en conditions stériles

(Figure II-6). Le mélange est assuré par un agitateur magnétique. Le réacteur est un réacteur à double enveloppe qui permet la régulation de la température à 35°C. Les pompes d'alimentation et de soutirage sont programmées de façon à opérer 4 cycles de soutirage-alimentation par jour. Le volume pompé par cycle est calculé par pesée hebdomadaire des réservoirs d'alimentation et de soutirage. Le temps de fonctionnement des pompes est ajusté à partir de ce calcul, de façon à appliquer un TSH de 20 jours. 80 cycles se succèdent au cours d'un TSH ; ce mode semi-continu est donc assimilable à un mode continu.

La boue d'alimentation (stérile et dopée) est continuellement agitée par un agitateur magnétique. Tout comme la boue de soutirage, elle est maintenue dans une enceinte réfrigérée pour limiter leur évolution. Un septum placé sur la sortie gaz permet le prélèvement pour une analyse de la composition du biogaz. La sortie gaz du réacteur est reliée à un système d'éprouvette renversée permettant la mesure du biogaz produit.

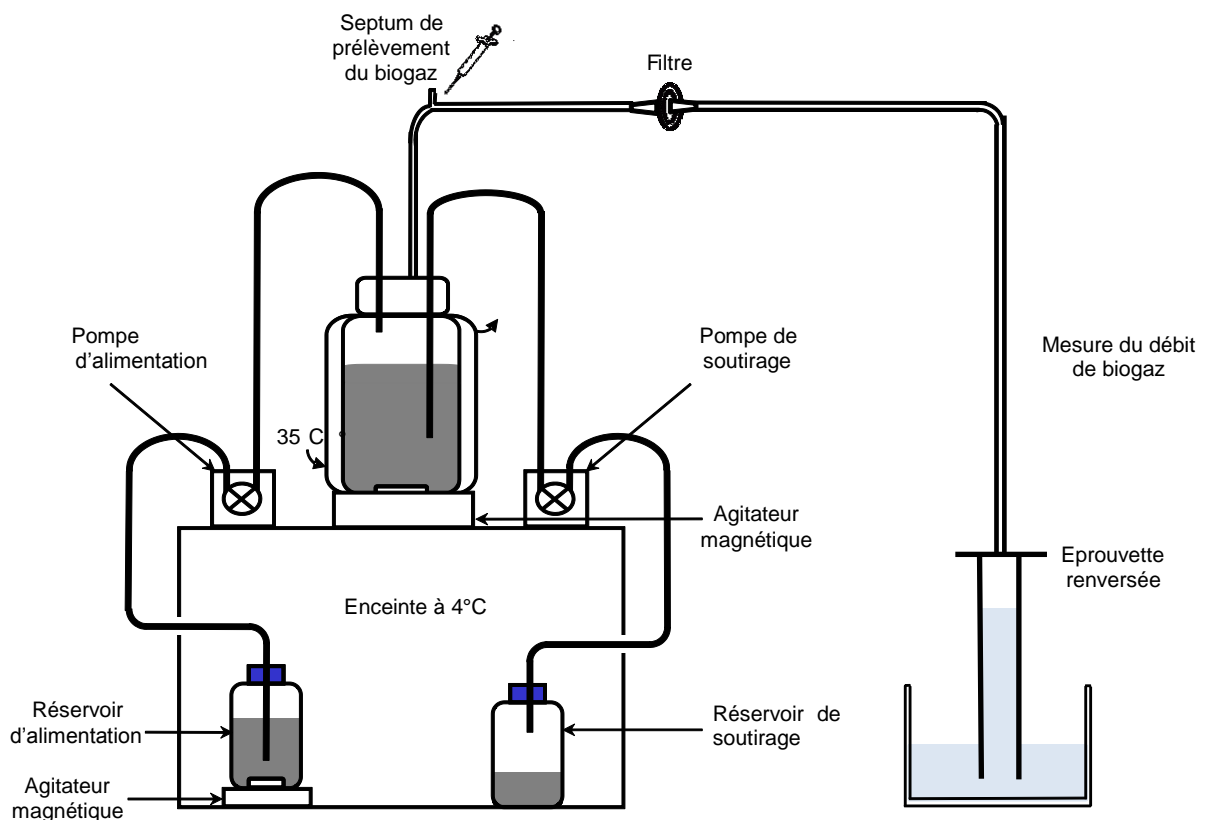


Figure II-6: Dispositif semi-automatisé de digestion anaérobie

II.6.2. Etude en microcosme

L'étude en microcosme est réalisée dans l'unité de recherche « Hydrosystèmes et bioprocédés » de l'IRSTEA d'Antony. La préparation des fioles et les analyses de gaz au temps initial sont réalisées conjointement avec Carolina Hoyos-Hernandez, étudiante en

thèse. Le suivi des microcosmes est réalisé par Carolina sous la direction de Laurent Mazéas et Théodore Bouchez.

La boue de sortie du réacteur précédemment décrit est utilisée pour des tests isotopiques en microcosme. Le principe est de suivre la dégradation d'un substrat marqué isotopiquement avec du Carbone (lourd) ^{13}C . Des analyses en GC-C-IRMS permettent de détecter un enrichissement du biogaz produit en ^{13}C , preuve d'une minéralisation du substrat étudié.

Compte tenu du coût des molécules marquées au ^{13}C , il n'est pas envisageable d'effectuer ses tests sur un cocktail de molécules. Le phénanthrène est retenu comme substrat d'étude. Les concentrations en phénanthrène marqué au ^{13}C et le volume de boue à incorporer dans le microcosme, sont calculées de manière à produire suffisamment de biogaz isotopique ^{13}C pour être détecté par les méthodes de mesure employées et être dans une fourchette de détection au-dessus des enrichissements naturels, sans pour autant apporter par la biomasse une quantité trop importante de Carbone 12 qui diluerait le carbone 13 (Tableau II-5).

Tableau II-5: Conditions expérimentales des tests isotopiques

Condition	Concentration en phénanthrène	Volume de boue	Facteur de dilution de la boue
Condition 1	0,1 mg/L	0,5 mL	100
Condition 2	1 mg/L	5 mL	10
Condition 3	3 mg/L	5 mL	10

Afin de réaliser le dopage en phénanthrène marqué au ^{13}C , une solution concentrée est préparée. Le phénanthrène (dont tous les carbones sont marqués au ^{13}C) commercialisé sous forme de poudre (Cortecnet) est dissout dans de l'éthanol. La solution obtenue a une concentration calculée de 1,4 g/L. Un volume de solution concentrée (correspondant aux conditions expérimentales choisies (Tableau II-5) est introduit à l'aide d'une seringue dans une fiole pénicilline pyrolysée et stérilisée de 50 mL. Après évaporation du solvant, 5 ou 0,5 mL de boue de sortie de réacteur sont ajoutées ainsi que du surnageant de cette même boue de sortie pour obtenir un volume d'essai de 50 mL. 2 répliqua sont réalisés par condition. Une troisième fiole est réalisée dans les mêmes conditions mais la solution de dopage utilisée n'est pas marquée (solution de phénanthrène concentrée préparée comme dans le paragraphe II.1.1.2). Enfin une quatrième fiole, dite abiotique, est préparée pour chaque condition, selon la même procédure, en ajoutant dans la solution de l' HgCl_2 (méthode de stérilisation couramment utilisée pour stériliser des échantillons de sol) à une concentration finale de 1,5 g/L. Les fioles sont ensuite fermées à l'aide d'un septum et scellées par une bague métallique. L'anaérobiose est obtenue en remplaçant l'air présent dans le ciel gazeux des microcosmes par de l'azote à l'aide d'une rampe à vide réalisée à la demande de

l'IRSTEA par la société Swagelo. Les incubations sont réalisées dans une enceinte thermostatée à 35°C.

La composition isotopique du CH₄ et du CO₂ est analysée à l'aide d'un couplage en GC (Trace GC Ultra, Thermo Electron Corporation), un four de combustion (C) (Finnigan GC combustion II, Thermo Electron Corporation) et un spectromètre de masse isotopique (IRMS). 100 µL d'échantillon gazeux sont injectés dans l'injecteur grâce à une seringue à gaz. Le CH₄ et le CO₂ sont séparés par une colonne (Paraplot). L'injecteur est utilisé en mode split avec un ratio de 20 et est maintenu à une température de 150°C. Le four de la GC est programmé pour maintenir la température à 35° pendant 3 min, avant un montée en température (rampe de 60°C/min) jusqu'à un palier de 180°C, maintenu pendant 24 s. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un flux de 1,8 mL/min. Les gaz traversent le four capillaire de combustion de l'appareil (tube de quartz rempli d'oxyde de cuivre porté à 940°C, où ils sont transformés en CO₂). D'autres composés comme de l'eau ou des oxydes d'azote peuvent également être formés. Les oxydes d'azote sont réduits en N₂ en traversant un four capillaire rempli de cuivre porté à 600°C. L'eau quant à elle, est piégée par une membrane hygroscopique. Le CO₂, produit de la combustion de chaque composé carboné ainsi purifié, est introduit dans la source de l'IRMS, où il est chargé positivement. Les ions CO₂⁺ sont accélérés et projetés sous forme d'un faisceau très fin dans un tube soumis à un champ magnétique. Les différentes formes isotopiques sont dérivées sur des trajectoires circulaires en fonction de leur masse. Trois collecteurs distincts (3 cages de Faraday) permettent leur détection. Les particules sont de masse m/z 44, 45 et 46. Des signaux électriques sont générés et dépendent de la quantité d'ions collectés. L'amplificateur, relié aux collecteurs, permet d'amplifier ces signaux qui sont ensuite transmis à un ordinateur. Là, ces données sont analysées et les rapports isotopiques 45/44 et 46/45 sont déterminés et comparés à ceux d'un gaz de référence introduit en début et fin d'analyse. Ces données permettent de calculer le rapport ¹³C/¹²C de chaque composé du mélange. La répétabilité de la mesure est testée en effectuant chaque analyse 3 fois.

II.7. Analyses des données

II.7.1. Détermination des coefficients de partage des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Le dosage de chaque HAP dans la boue totale ($C_{i\text{tot}}$) et le particulaire ($C_{i\text{part}}$) a été réalisé selon la méthode exposée § II.3.3.1 alors que le dosage des concentrations dans la phase aqueuse ($C_{i\text{aqu}}$) et libre ($C_{i\text{libre}}$) a été réalisé par la méthode exposée en II.3.3.2.

Pour chaque composé i , à partir de la concentration dans la boue totale ($C_{i\text{tot}}$) en µg/L et de la concentration dans la phase aqueuse ($C_{i\text{aqu}}$) en µg/L, nous avons calculé les

concentrations en HAP dans la phase particulaire ($C_{i\ part}$) en $\mu\text{g/L}$. D'autre part, le dosage dans le particulaire effectué par HPLC nous permet de calculer $C_{i\ part\ [MES]}$ en $\mu\text{g/g MES}$.

Nous en avons donc déduit pour chaque réacteur la valeur moyenne de la matière sèche du particulaire en g MES/L selon l'expression :

$$\text{MES} = \sum (C_{i\ part} (\mu\text{g/L}) / C_{i\ part\ [MES]} (\mu\text{g/g MES})) / n$$

avec $C_{i\ part}$, la concentration du composé i dans le particulaire en $\mu\text{g/L}$ et n le nombre de composés dosés.

La matière sèche totale MS est constituée de la matière sèche du particulaire (MS_{part} , soit les MES) et de la matière sèche colloïdale et dissoute MS_{DCM} , nous avons donc calculé pour chaque réacteur la MS_{DCM} selon l'expression :

$$MS_{DCM} = MS - \text{MES}$$

La concentration d'un composé i dans la phase aqueuse correspond à la somme des concentrations du composé sous sa forme libre $C_{i\ libre}$ et sorbée à la matière dissoute et colloïdale $C_{i\ DCM}$. Grâce aux concentrations $C_{i\ aqu}$ et $C_{i\ libre}$ mesurées par la méthode SPME, on calcule une concentration $C_{i\ DCM}$ en $\mu\text{g/L}$. Cette concentration peut être ramenée en $\mu\text{g/kg}_{DCM}$ ($C_{i\ DCM[DCM]}$) en utilisant la formule :

$$C_{i\ DCM[DCM]} (\mu\text{g/kg}_{DCM}) = 1000 * C_{i\ DCM} (\mu\text{g/L}) / MS_{DCM} (\text{g/L})$$

Les coefficients de partition de chaque composé, dans le particulaire et dans le compartiment DCM, $K_{i\ part}$ et $K_{i\ DCM}$, sont calculés respectivement en utilisant les formules :

$$K_{i\ part} = C_{i\ part\ [MES]} / C_{i\ libre}$$

$$K_{i\ DCM} = C_{i\ DCM[DCM]} / C_{i\ libre}$$

II.7.2. Analyses statistiques

Des tests statistiques sont utilisés lors de cette étude pour rechercher des liens entre les paramètres étudiés (test de corrélation et Analyse en Composante Principale, PCA) ou pour vérifier si les différences en terme de performance de dégradation des micropolluants, performance des réacteurs anaérobies, paramètres caractéristiques des communautés microbiennes, sont significatives ou non (Analyse de variance, ANOVA) et d'identifier quels groupes sont différents (test de Student Newman Keuls, SNK).

Ces différents tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel R version (R. Development Core Team 2010).

L'**analyse de la variance (ANOVA)** est un test statistique permettant de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population, c'est à dire qu'ils ont statistiquement une même moyenne. C'est une généralisation du test de Student. Ainsi pour ce test, l'hypothèse nulle (H_0) correspond au cas où les distributions suivent la

même moyenne et l'hypothèse alternative est qu'il existe au moins une distribution dont la moyenne s'écarte des autres moyennes. Le rejet ou non de l'hypothèse nulle est décidé en étudiant la p-value (probabilité critique). Si la p-value est inférieure à 0,05 alors H_0 est rejetée avec 5 % de risque. Si elle est supérieure à 0,05, le risque est trop grand pour rejeter H_0 , l'hypothèse nulle est donc validée.

Le **test Student Newman Keuls (SNK)** est un test de comparaison *a posteriori* qui permet, lorsqu'un test de type ANOVA révèle des différences entre échantillons, de savoir quels sont les échantillons qui diffèrent entre eux. Dans notre étude, il est réalisé en utilisant la fonction `snk` de la librairie R `mutoss` (MuToss coding Team et al., 2010)

Le **coefficient de corrélation de Pearson** est un coefficient de corrélation linéaire simple qui permet d'appréhender le degré de liaison qui peut exister entre deux variables, en mettant en évidence le sens de la liaison et son intensité. En effet s'il est nul les variables sont indépendantes, plus il se rapproche de 1 plus les variables sont liées. S'il est positif les variables évoluent dans le même sens, s'il est négatif elles évoluent dans des sens opposés.

L'**Analyse en Composante Principale (ACP)** permet l'examen des corrélations entre de nombreuses variables. Elle permet de visualiser et d'analyser rapidement les corrélations entre les variables et de visualiser et d'analyser les différents échantillons décrits par les variables sur un graphique à deux dimensions (construit de manière à maximiser les différences entre échantillons). Elle permet aussi de représenter sur le même plan, échantillons et variables et ainsi d'identifier des tendances. Des corrélations entre la distribution des échantillons sur l'ACP avec d'autres paramètres (fonctionnement du procédé, conditions opératoires, inoculum source) ont été réalisées. La librairie R `vegan` (Oksanen et al., 2010) a été utilisée.

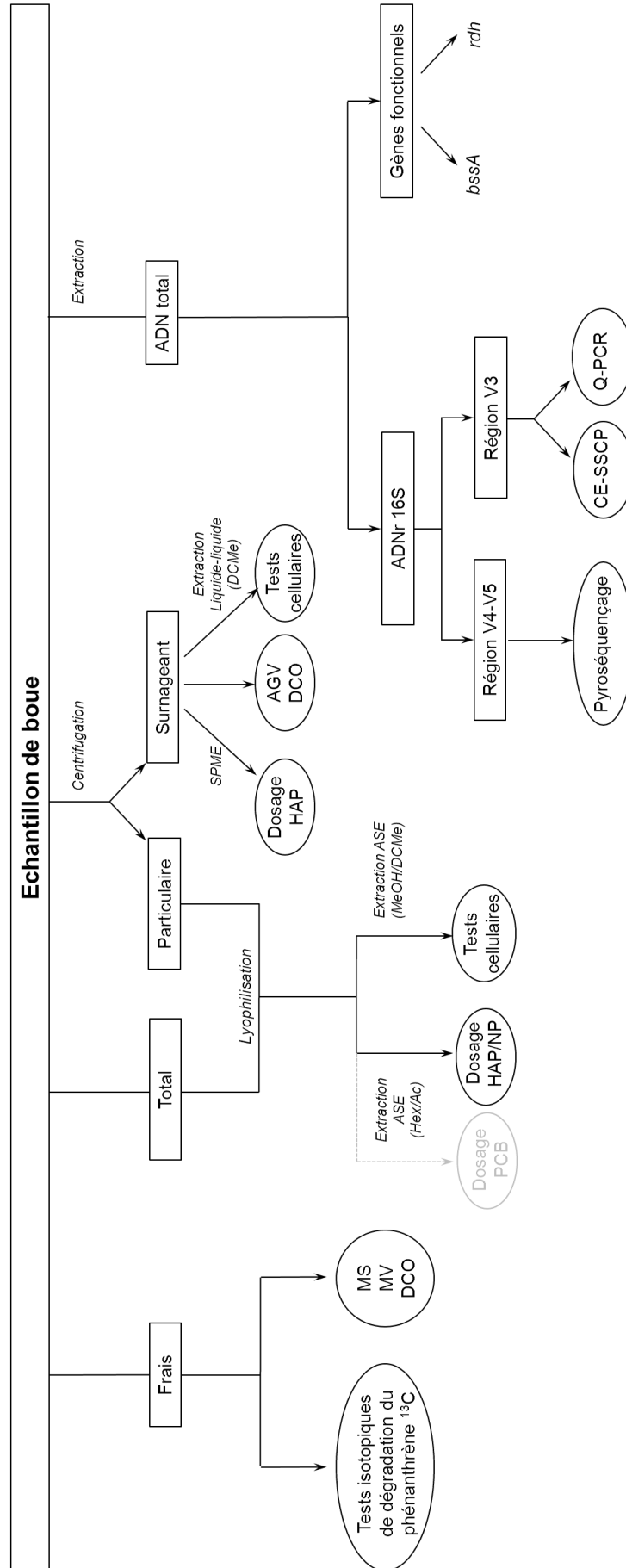


Figure II-7 : Aperçu des différents tests et analyses effectués sur un échantillon de boue

En gris, protocoles effectués uniquement sur l'échantillon total de boue.

Hex : hexane, Ac : acétone, MeOH : méthanol, DCMe : dichlorométhane

Chapitre III. EXTRACTION DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES

Dans ce chapitre, après avoir explicité la démarche de choix des écosystèmes d'intérêts, nous présentons la mise au point expérimentale qui nous a permis d'extraire de chaque écosystème, les communautés microbiennes d'intérêt et plus particulièrement celles de l'écosystème boue.

III.1. Extraction des microorganismes des écosystèmes d'intérêts

Le but de cette étape est de récupérer les microorganismes d'écosystèmes choisis, sans affecter leur viabilité et leur diversité, de façon à pouvoir les utiliser comme inoculum par la suite.

III.1.1. Choix des écosystèmes d'intérêts

Une des raisons de la variabilité d'un écosystème peut être son histoire et/ou son adaptation vis à vis des polluants. En effet, il existe des écosystèmes ayant été exposés à des degrés de contamination différents. En France, on peut citer en exemple d'écosystèmes fortement contaminés, les sédiments et sols de la vallée du Rhône (fortement contaminés en PCB), ou encore les sédiments marins contaminés aux HAP lors du naufrage de l'Erika ou les sols provenant d'anciennes cokeries. Les boues de STEP sont généralement moyennement ou faiblement contaminées et certains sols de tourbière n'ont jamais, voire presque jamais, vu ces types de micropollutions. Chacun de ces écosystèmes possède une variabilité intrinsèque à dégrader les micropolluants. Cette variabilité peut provenir de la variabilité des caractéristiques de la matrice et/ou de la variabilité de la communauté microbienne. Pour notre étude, 4 écosystèmes à l'historique de pollution différent ont été choisis : un écosystème sédimentaire fortement contaminé en PCB, un sol fortement contaminé en HAP, une boue par laquelle transite de façon régulière des polluants mais en faible concentration et enfin un écosystème de tourbière dont la structure est relativement proche de celle d'une boue.

III.1.2. Premiers tests d'un protocole d'extraction basé sur un gradient de densité

A partir de protocoles, établis initialement pour récupérer des microorganismes provenant du sol (Courtois et al., 2001; Maron et al., 2006; Bertaux et al., 2007) et adaptés à d'autres écosystèmes (Barra Caracciolo et al., 2005), un protocole utilisant un gradient de densité réalisé à l'aide d'un produit inerte de type sucre, le Nycodenz (ici du Gentodenz) (<http://www.gentaur.com/gentodenz.htm>), a été testé sur des échantillons de sol, de boue et de tourbe (comme décrit au § II.1.2.2).

Le but est de séparer les cellules bactériennes de leur matrice grâce à l'utilisation d'un gradient de densité de Gentodenz lors d'une centrifugation. La centrifugation mène à la sédimentation des particules de densité supérieure à la solution de Gentodenz et ainsi à la séparation des cellules bactériennes qui forment une bande entre le Gentodenz et une solution saline.

Sur les échantillons de sol et de sédiment, les résultats ont été probants et ont permis la différenciation d'une phase contenant les cellules et sa récupération (Figure III-1).

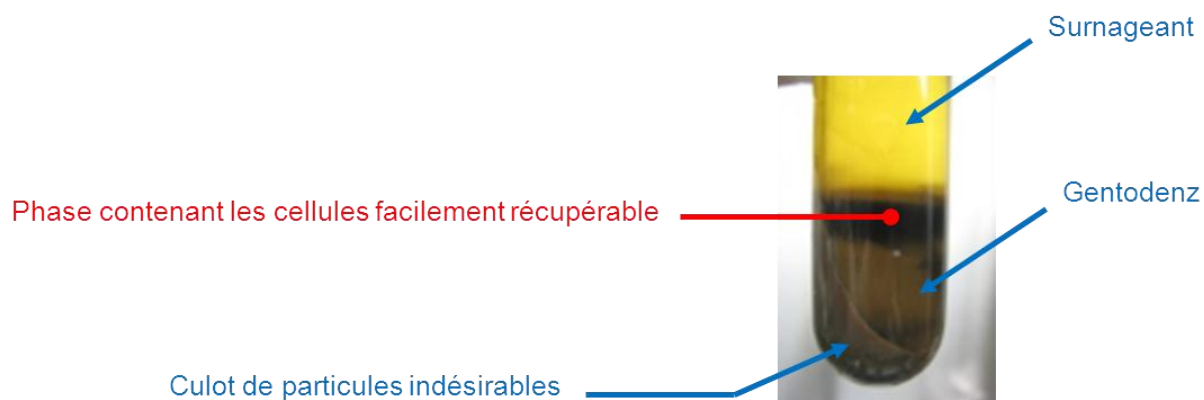


Figure III-1: Gradient de Gentodenz sur un échantillon de sol

Les tests effectués sur la tourbe n'ont pas permis la différenciation de phases. En effet, l'ensemble de l'échantillon s'est retrouvé au-dessus de la phase contenant le Gentodenz (Figure III-2).

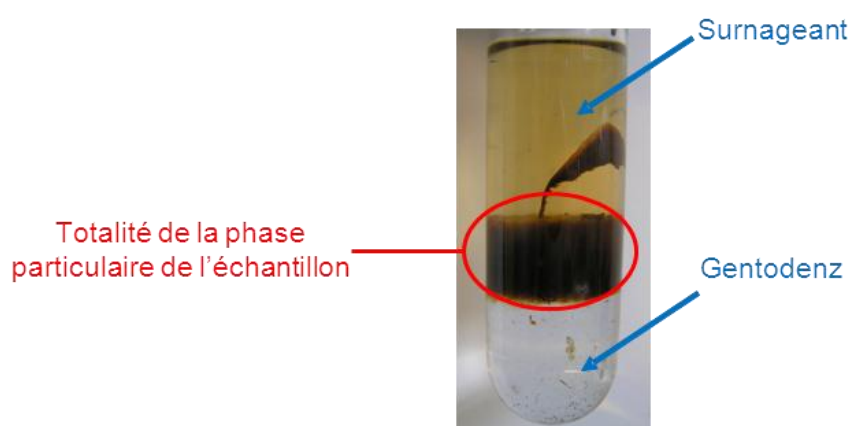


Figure III-2: Gradient de Gentodenz sur un échantillon de tourbe

Sur les échantillons de boue, les résultats n'ont pas permis la différenciation et la récupération dans des conditions convenables de la phase cellulaire. En effet, sur ces échantillons une partie de la phase contenant les cellules est récupérable mais la majorité de cette phase, du fait de sa texture visqueuse, n'est pas récupérable proprement sans la re-mélanger avec la phase contenant le Gentodenz et le surnageant, voir même avec le culot (Figure III-3).

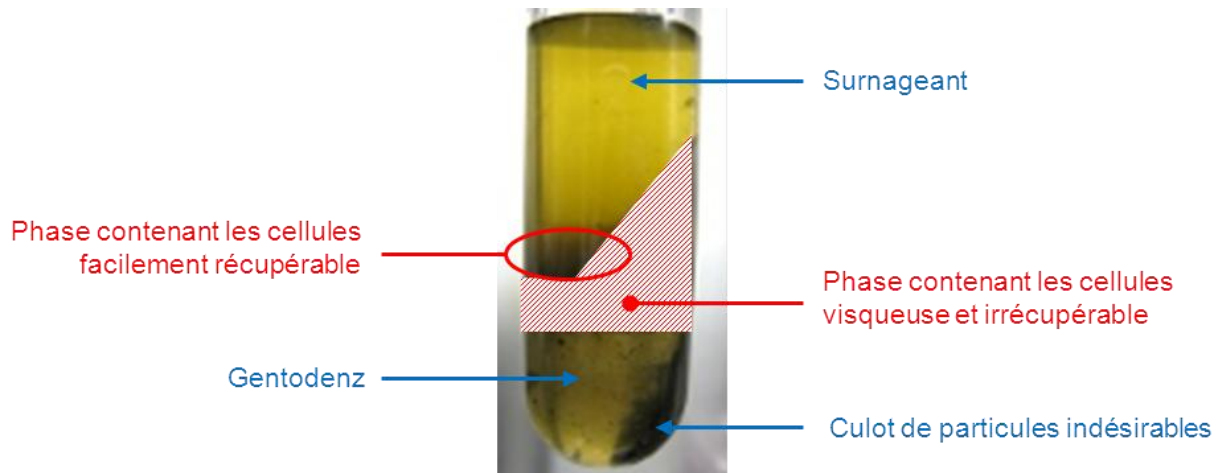


Figure III-3: Gradient de Gentodenz sur un échantillon de boue

La présence de cette phase est imputable à la structure même de la boue. En effet, la boue a une structure qui peut être divisée en trois compartiments suivant la taille des particules : la phase soluble contenant l'eau et les matières dissoutes; la phase colloïdale constituée de solides finement divisés ; la phase particulaire regroupant des amas de cellules et de matières organiques appelés floccs (Figure III-4).

Ces floccs possèdent une géométrie dite fractale à deux dimensions minimum. Ils possèdent différentes tailles. Ainsi, on peut observer des floccs de diamètre de l'ordre de 50 à 100 μm (Andreadakis, 1993) avec des pores de l'ordre de 10 μm (Chu et Lee 2004). Ces structures sont appelées « floccs » ou « macrofloccs ». Elles sont constituées des bactéries vivantes ou mortes, isolées ou en micro-colonies, de bactéries filamenteuses (jouant un rôle de structure), d'exopolymères et de « microfloccs ». Les microfloccs sont des amas de cellules beaucoup plus denses et de taille plus petite possédant des pores de 4 μm (Chu et Lee 2004). La cohésion et la structure de ces amas complexes se font majoritairement par les interactions entre microorganismes, exopolymères et ions métalliques. Ces trois composants sont intimement liés et forment une sorte de gangue autour des floccs (Nosyk et al., 2008).

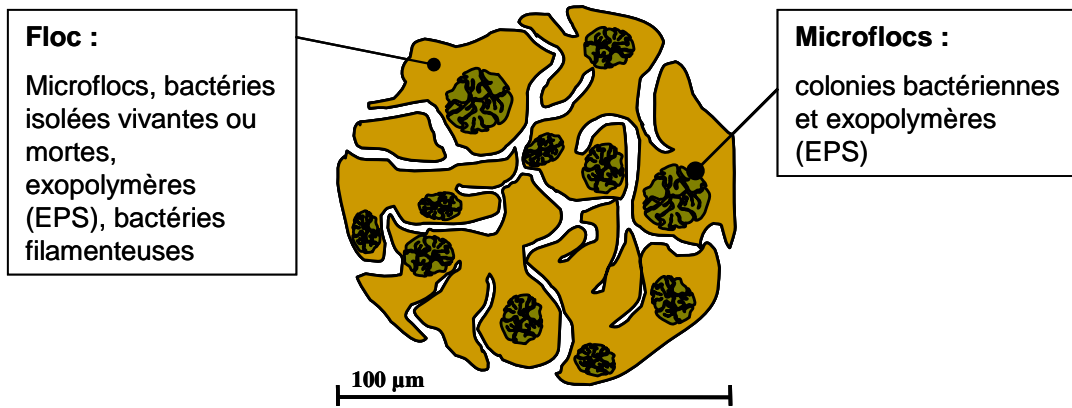


Figure III-4: Schématisation de la structure particulière de la boue en floc

Le caractère visqueux de la phase non récupérable est imputable à la présence autour des microorganismes de cette gangue d'exopolymères. Pour pouvoir extraire de façon efficace les microorganismes présents dans la boue, il est donc nécessaire de se débarrasser de cette gangue. Un protocole d'extraction des cellules présentes dans la boue a donc été mis au point. La stratégie élaborée est d'utiliser des enzymes pour désagréger la gangue d'exopolymère qui entoure les bactéries et ainsi obtenir et récupérer des bactéries libres et viables (Figure III-5).

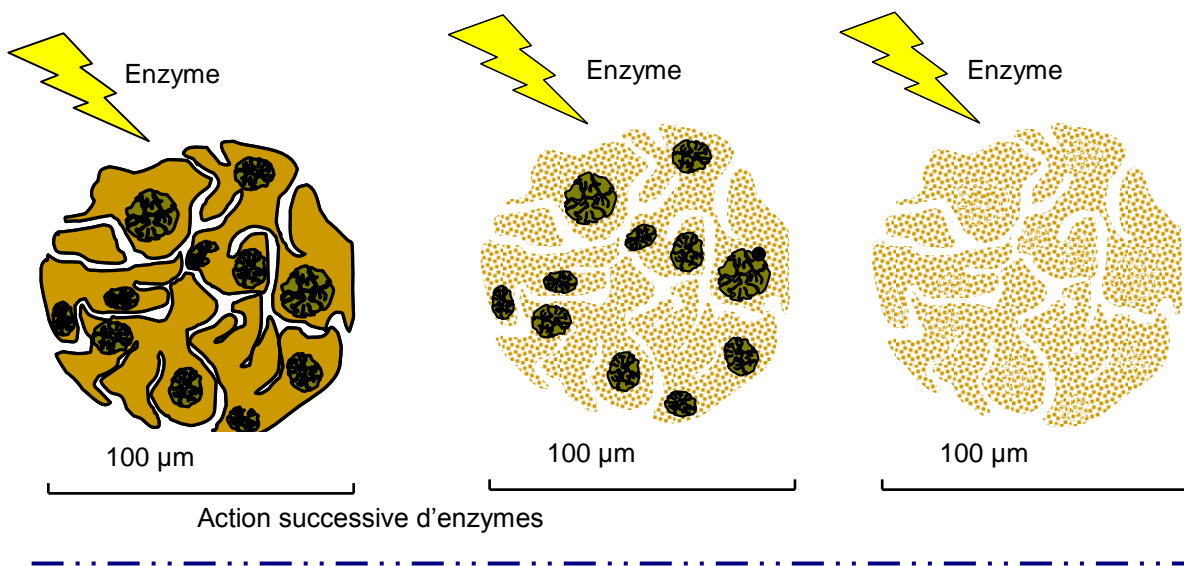


Figure III-5: Schéma de la stratégie de lyse des flocons de la boue par un prétraitement enzymatique

III.2. Mise au point du protocole d'extraction des communautés microbiennes de la matrice boue

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF AN ENZYMATIC AND CELL FLOTATION TREATMENT FOR THE RECOVERY OF VIABLE MICROBIAL CELLS FROM ENVIRONMENTAL MATRICES SUCH AS ANAEROBIC SLUDGE

Florence Braun, Jérôme Hamelin, Gaëlle Gévaudan, and Dominique Patureau

D'après l'article publié dans « Applied and Environmental Microbiology », Dec 2011

Abstract: Efficient dissociation of microorganisms from their aggregate matrix is required to study the microorganisms without interaction with their native environment (e.g., biofilms, flocs, granules, etc.) and to assess their community composition through the application of molecular or microscopy techniques. To this end, we combined enzymatic treatments and a cell extraction by density gradient to efficiently recover anaerobic microorganisms from urban wastewater treatment plant sludge. The enzymes employed (amylase, cellulase, DNase, and pectinase) as a pretreatment softly disintegrated the extrapolymeric substances (EPS) interlocked with the microorganisms. The potential damaging effects of the applied procedure on bacterial and archaeal communities were assessed by studying the variations in density (using quantitative PCR), diversity (using capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism fingerprinting [CE-SSCP]), and activity (using a standard anaerobic activity test) of the extracted microorganisms. The protocol preserved the general capacity of the microbial community to produce methane under anaerobic conditions and its diversity; particularly the archaeal community was not affected in terms of either density or structure. This cell extraction procedure from the matrix materials offers interesting perspectives for metabolic, microscopic, and molecular assays of microbial communities present in complex matrices constituted by bioaggregates or biofilms.

III.2.1. Introduction

The quantification of bacterial abundance and the study of bacterial physiology are essential to understand the role of microorganisms in wastewater treatments. Anaerobic sludge is an aggregation of several heterogeneous compounds (Nielsen et al. 2004), like extracellular polymeric substances, extracellular DNA, and dead microorganisms, that can induce misinterpretation of results from PCR or fluorescence-based techniques. The separation of the microorganisms from their original matrices may reduce this problem of interference.

Techniques based on the density gradient centrifugation to remove microorganisms from their ecosystem were first optimized on soil samples (Barra Caracciolo et al. 2005;

Courtois et al. 2001; Delmont et al. 2011; Lindahl et al. 1996; Maron et al. 2006) and were thereafter extended to other matrices, like sediments (Amalfitano and Fazi, 2008). Such protocols rely on a significant difference in density between microbial cells and their surrounding environment (e.g., mineral particles of the soil). These techniques combine actions of mechanical dispersal and chelating agents like polyvinylpyrrolidone (PVPP) (Holben et al., 1988), Na₂EDTA (Bertaux et al., 2007), and Tween 20 (Bertaux et al., 2007) to separate soil bacteria from the matrix. Once in suspension, the microorganisms are then separated from some organic and mineral matter by a Nycodenz density gradient (Courtois et al., 2001). In aerobic and anaerobic sludges, microorganisms are organized in flocs or granules and are embedded with extrapolymeric substances (EPS), which constitute the majority of the organic matter (Jorand et al. 1995; Nielsen et al. 2004). EPS may have a biological origin, such as bacterial secretions or bacterial lysis, or they are molecules coming from the raw wastewater that are adsorbed on microbial cells. EPS are polysaccharides, proteins, lipids, DNAs, and humic substances.

Under methanogenic conditions, a huge diversity of microorganisms, including *Bacteria* and *Archaea* (Dey et al. 2006), are working in syntrophy to degrade organic matter into methane and carbon dioxide. The bacterial community is responsible for the initial hydrolysis of the organic matter into mainly volatile fatty acids. Then, these molecules are transformed into methane and carbon dioxide by the archaeal community (Batstone et al. 2002).

Several studies have dealt with the enzymatic hydrolysis of sludge to characterize the EPS without checking cell viability (Dey et al. 2006; Wawrzynczyk et al. 2007). Cocktails of protease, lipase, cellulase, α -amylase, dextrase, endoxylanase, and polygalacturonase were tested (Dey et al. 2006; Wawrzynczyk et al. 2007). None of these studies focused the recovery of viable cells. However, such cocktails, in particular those containing protease and lipase, may damage the cells and may impact the viability of microorganisms by disrupting the membrane, which is mainly constituted of proteins and lipids. Another enzymatic cocktail was thus tested in this study.

This study presents a new protocol, coupling (i) a soft disintegrating of the sludge by enzymatic pretreatments and (ii) a recovery of microorganisms by cell flotation, which aimed at inoculating viable and active cells in anaerobic digesters. The conservation of the structure and the diversity of bacterial and archaeal communities as well as their functional capabilities were then checked carefully.

III.2.2. Material and methods

Sludge source. All experiments were performed using an anaerobic sludge from an urban wastewater treatment plant. The sludge was stored at room temperature to

preserve the activity of microorganisms. The anaerobic sludge contained $41.6 \pm 0.5 \text{ g.L}^{-1}$ of dry matter.

Enzymatic treatments. Two hundred fifty milliliters of anaerobic sludge (corresponding to about 10 g of dry matter) was centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min at 4°C . The resulting pellet was resuspended in 250 mL of 80 mM phosphate buffer with MgCl_2 at a final concentration of 20 mM. To optimize the hydrolysis of sludge EPS, sodium triphosphate pentabasic (STPP; Sigma) was added to the buffer at a final concentration of 50 mM (Dey et al. 2006; Wawrzynczyk et al. 2007). The STPP interacted with humic compounds to reduce the enzyme adsorption in sludge. Previous studies showed that 50 mM STPP increased the activity of enzymes such as α -amylase (Wawrzynczyk et al. 2008).

Figure III-6 summarizes the succession of enzymatic steps. The quantity of enzymes was based on an estimation of the sludge composition with respect to polysaccharides, complex carbohydrates, cellulose, and DNA (Simon et al., 2009). Each enzyme was added in large excess to prevent inhibition of enzyme activity by sorption. Twenty units of α -amylase (from *Bacillus* sp.; Duramyl; 300 U.g^{-1} ; Sigma), 330 U of pectinase (from *Aspergillus niger*; $1,000 \text{ U. g}^{-1}$; Sigma), 5,600 U of cellulase (from *Aspergillus* sp.; Carezyme; $1,000 \text{ U.g}^{-1}$; Sigma), and 250 U of DNase (RQ1 RNase-free DNase; Promega) were added successively, and the suspension was incubated 60 min at 37°C . To optimize enzyme activity, the buffer was first adjusted to pH 5 for the α -amylase and pectinase additions, and then adjusted to pH 7 for the cellulase and DNase additions. The cell suspension was finally centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min at 4°C , and the resultant pellet was resuspended in 250 mL of physiological water.

Cell flotation with Gentodenz gradient. After the enzymatic treatments, a method based on the Nycodenz gradient, routinely used to extract cells from soil, was employed. The suspension was centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min at 4°C , and the whole pellet was resuspended in 50 mL of PVPP buffer (130 mM NaCl, 7 mM $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$, 3mM NaH_2PO_4 , 5 mM $\text{Na}_2 \text{EDTA}$, pH 7.3; PVPP [3.5 mg.mL^{-1}]; and 1% Tween 20) (Bertaux et al., 2007). The Tween 20 and Na_2EDTA in this buffer allowed particle dispersion. Like STPP, PVPP reduces interactions of cell material with phenolic groups of humic acids via hydrogen binding (Cullen et Hirsch 1998). The suspension was mixed on ice in a blender (T15 basic; Ultra Turrax) at maximum speed for 90 s and agitated at 37°C overnight (Shin et al. 2010). To separate the cells from other sludge compounds, a high-speed centrifugation procedure with a density gradient was used (Barra Caracciolo et al., 2005). The gradient was elaborated with Gentodenz (Gentaur; France). Gentodenz is similar to Nycodenz, as it is a water-soluble, nonionic, and nontoxic derivate of benzoic acid and has the same density. A Gentodenz solution with a density of 1.3 g.mL^{-1} was

obtained by dissolving 40 g of Gentodenz in 50 mL of sterile water, as recommended by Lindahl & Bakken (1995).

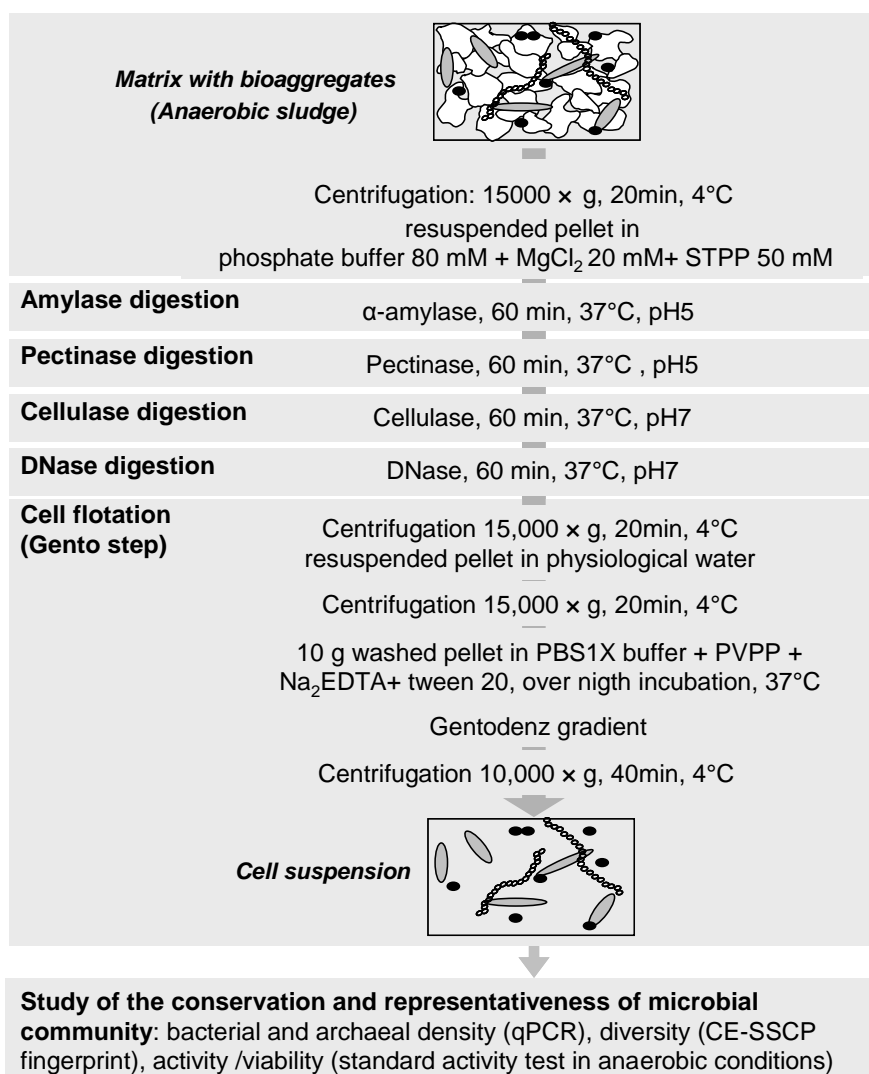


Figure III-6: Extraction methodology based on three main steps: initial step, enzymes pre-treatment step and final step.

The initial step corresponded to a re-suspension of the sludge suspended matter in a defined buffer, the pre-treatment step to successive application of 4 enzymes (amylase, pectinase, cellulose, DNase), and the final step to cell flotation with density gradient extraction. The density and diversity of microbial communities were also studied at each protocol step.

The cell suspension in the buffer was divided into two 20-mL subsamples. Sixteen milliliters of Gentodenz solution was carefully added below the 20 mL of cell suspension in a centrifuge tube. The cell suspension and the Gentodenz solution formed two distinct phases, with the latter on the bottom. The tubes were then centrifuged at 10,000 × g for 40 min at 4°C. At the end of the centrifugation, four distinct phases were observed Figure III-7. At the bottom, a pellet with the sludge particles was consistently observed. In the middle of the centrifuge tube, a large layer of cells floating over the dense Gentodenz solution and below the water-based buffer was observed. The layer of cells was

recovered with a pipette as described previously (Lindahl 1996). The total volume of the cell layer was then divided into six 10-mL subsamples. Cells were washed twice by adding 20 mL of sterile water with 0.8% NaCl to remove residual Gentodenz, followed by centrifugation at $16,000 \times g$ for 60 min at 4°C. Cells accumulated at the bottom of the centrifuge tubes. At the end, the cell pellet corresponding to 250 mL of initial sludge was resuspended in 20 mL of sterile saline water.

Extraction of DNA. An aliquot of 1 mL of sludge at each protocol step Figure III-6 was first centrifuged for 10 min, and then the pellet was resuspended by vortexing in 115 μL of 10% (wt/vol) *N*-lauroyl-sarcosine (N-LS) and 385 μL of 4 M guanidine thiocyanate–0.1 M Tris-HCl (pH 7.5). The homogeneous sample (500 μL) was stored at -20°C prior to DNA extraction. Extraction and purification of total DNA were carried out using the procedure described by Godon et al. (1997).

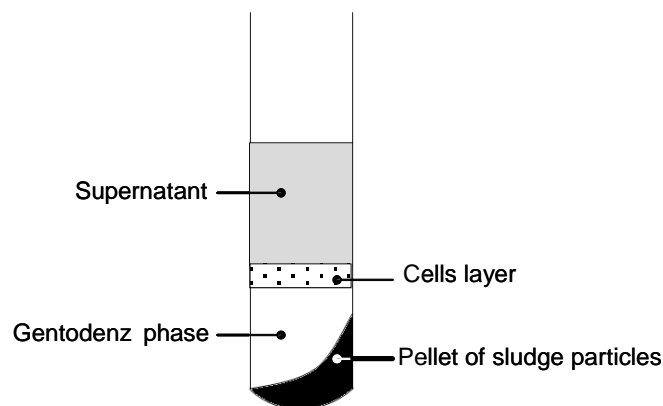


Figure III-7: Density gradient centrifugation tube with the layer of cells extracted from the enzymatically pre-treated sludge.

PCR amplifications. To analyze the structure of the bacterial and archaeal communities, the V3 region of the 16S rRNA gene was amplified. The primers W49F and W104R were used for *Bacteria* (Shin et al., 2010), and W274R and W275F were used for *Archaea* (Tableau III-1). PCR amplifications were carried out using Mastercycler thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The PCR mixture used for the amplification of bacterial sequences contained 5 μL of 10 \times *Pfu* Turbo buffer, 200 nM deoxynucleoside triphosphates (dNTP), 400 nM each primer, 1.25 U of *Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA), 1 μL of genomic DNA, and water added to obtain a final volume of 50 μL .

The PCR conditions were an initial denaturing step of 2 min at 94°C; 25 cycles of a three-stage program of 30 s at 94°C, 30 s at 61°C, and 30 s at 72°C; and a final elongation for 10 min at 72°C.

PCR mixtures used for the amplification of archaeal sequences contained 2.5 µL of 10× *Pfu* Turbo buffer, 200 nM dNTPs, 500 nM each primer, 0.625 U of *Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA), 0.5 µL of genomic DNA, and water added to obtain a final volume of 25 µL. The PCR conditions were an initial denaturing step of 2 min at 94°C; 30 cycles of a three-stage program of 30 s at 94°C, 30 s at 65°C, and 30 s at 72°C; and a final elongation for 10 min at 72°C.

All reactions were stopped by cooling the mixture to 4°C.

Tableau III-1: Primers used during CE-SSCP PCR and Q-PCR

Name	PCR/ Q-PCR	Sequence (5'-3')	dye	Targeted group	Reference
W49F	PCR	AGG TCC AGA CTC CTA CGG G		<i>Bacteria</i>	(Zumstein et al. 2000)
W104R	PCR	TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	3'-6-FAM	Universal	(Zumstein et al. 2000)
W274F	PCR	CCC TAC GGG GCG CAG CAG		<i>Archaea</i>	This study
W275R	PCR	TTA CCG CGG CGG CTG	3'-6-FAM	<i>Archaea</i>	This study
BAC338F	Q-PCR	ACTCC TACGG GAGGC AG		<i>Bacteria</i>	(Yu et al. 2005)
BAC805R	Q-PCR	GACTA CCAGG GTATC TAATC C		<i>Bacteria</i>	(Yu et al. 2005)
BAC16F	Q-PCR	TGCCA GCAGC CGCGG TAATA C	5'- Yakima yellow 3'- TAMRA	<i>Bacteria</i>	(Yu et al. 2005)
ARC787F	Q-PCR	ATTAG ATACC CSBGT AGTCC		<i>Archaea</i>	(Yu et al. 2005)
ARC1059R	Q-PCR	GCCAT GCACC WCCTC T		<i>Archaea</i>	(Yu et al. 2005)
ARC915F	Q-PCR	AGGAA TTGGC GGGGG AGCAC	5'-6-FAM 3'-TAMRA	<i>Archaea</i>	(Yu et al. 2005)

CE-SSCP. The resulting PCR products were then separated by capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). A CE-SSCP analysis permits the separation of DNA fragments of the same size but with different compositions (Sen et al., 2008). Briefly, 1 µL of diluted PCR product was added to 18 µL of formamide and 1 µL of internal size standard ROX 400 HD (Applied Biosystems, CA) diluted 10-fold. Each sample was then denatured for 5 min at 94°C and placed directly on ice for 5 min. CE-SSCP was performed using an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) equipped with four 50-cm capillary tubes filled with 5.6% conformation analysis polymer (Applied Biosystems) in the corresponding buffer and 10% glycerol. The injection of DNA in capillaries required 5 kV for 3 s. Electrophoresis was carried out at 15 kV and 32°C for about 30 min per sample.

Quantitative PCR (Q-PCR). PCRs were prepared using 96-well real-time PCR plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) and Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). Then, 12.5 µL of Express qPCR Supermix with premixed ROX (Invitrogen, France), 5 µL of DNA extract with three appropriate dilutions, 200 nM forward and reverse primers, 50 nM TaqMan probe, and water were added to obtain a final volume of 25 µL for all analyses (Tableau III-1).

An initial incubation of 20 s at 95°C and 40 cycles of denaturation (95°C, 15 s; 60°C, 1 min) were performed. One standard curve was generated from each assay by using 10-fold dilutions in sterilized water (Aguettant Laboratory, Lyon, France) of the PCR products from known environmental clones (Snell-Castro et al., 2005). Clones DF10 and LC103 were used as standards for *Archaea* and *Bacteria*, respectively. The initial DNA concentrations were quantified using the Infinite 200 PRO NanoQuant (Tecan, France). Two measurements were obtained per sample for each primer set.

The ratio of *Archaea* to *Bacteria* was estimated by calculating the average numbers of archaeal and bacterial cells. The average numbers of archaeal and bacterial cells were estimated by dividing the average number of 16S rRNA gene copies per cell by factors of 1.76 and 4.1, respectively, following the work of Klappenbach et al. (2001) and the rrnBD (<http://ribosome.mmg.msu.edu/rrndb/>).

Microbial activity measurement. In anaerobic conditions, microorganisms transform simple substrates such as glucose and acetate, into biogas (a mixture of CO₂, H₂, and CH₄). To check the viability of the recovered cells, standard batch incubations (Guo et al. 2010; Quéméneur et al. 2011) under anaerobic mesophilic conditions (35°C) were performed in 50-mL glass bottles. Portions (3.6 mL) of the final cell suspension were inoculated in 40 mL of phosphate buffer (8.74 mM Na₂HPO₄ 12H₂O, 61.37 mM KH₂PO₄) at pH 7. Two substrates were tested: glucose (1 g chemical oxygen demand g_{COD}.L⁻¹) and a mixture of glucose and acetate with 0.5 g_{COD}.L⁻¹ of each compound. Each bottle was flushed with nitrogen for 5 min, ensuring anaerobic conditions. The bottles were then capped with a rubber stopper and incubated at 35°C for 26 days. Each experiment was carried out in triplicate.

Chemical analysis. Biogas production was measured using differences in pressure. Biogas composition (CH₄, CO₂, H₂, and N₂) was analyzed by gas chromatography (GC-14A; Shimadzu) (Aceves-Lara et al., 2008). The biogas production performances were evaluated by calculating the total accumulated biogas produced per initial substrate COD (mL.g_{COD}⁻¹).

Statistical analyses. All statistical analyses were carried out using R 2.10.1 (R Development Core Team, 2010). In order to investigate whether bacterial and archaeal communities differed in the course of the protocol, the bacterial and archaeal quantity, the *Archaea/Bacteria* ratio, and the structure of communities were studied.

Differences in bacterial and archaeal quantity among protocol steps were determined with an analysis of variance (ANOVA) and a Student-Newman-Keuls (SNK) test. The ANOVA test was used to determine if there were significant differences between groups. The SNK test was used to determine which groups were significantly different. The same statistical tests were applied to study the differences in the *Archaea/Bacteria* ratios after each treatment.

To study the variation of structure of both communities in the course of the protocol, the samples were gathered in three groups large enough to allow statistical testing. Groups 1, 2, and 3 were made up of samples of the initial step, samples of the different enzyme steps, and samples of the Gentodenz step, respectively.

The CE-SSCP profiles were aligned with the internal standard, ROX, to correct any change in the electrophoretic motility between runs. The sums of the peak areas were normalized to unit before statistical analysis. The peak areas were determined using a rolling-ball algorithm. The Simpson diversity index (D) was computed for each fingerprinting profile by using the formula $D = 1 / \sum(\text{peak areas})^2$, using the implementation of the R StatFingerprints library (Michelland et al., 2009). The differences of diversity between the profiles were estimated with ANOVA or SNK tests.

The matrices of similarity were calculated on the basis of Euclidean distances between each pair of CE-SSCP profiles. An analysis of similarity (ANOSIM) was used to investigate the effects of the protocol steps, considered as a qualitative variable, on the variation of similarity data (Clarke, 1993). Comparisons of mean distances were used to calculate the ANOSIM R-statistic (R) with Monte Carlo permutations. The group tested was considered to be significantly different when P was < 0.05 and R was > 0.25 . The value of R indicates the degree of similarity between the groups ($R > 0.75$, well-separated groups; $0.50 < R < 0.75$, separated but overlapping groups; $0.25 < R < 0.50$, separated but strongly overlapping groups). The communities of tested groups were considered to be not significantly different from each other or from other groups if P was > 0.05 , regardless of the value of R (Ramette, 2007).

III.2.3. Results

To separate the microbial cells of the sludge, the protocol of cell flotation with Gentodenz was initially used without pretreatment, as for a soil sample. It resulted in the formation of a viscous phase between Gentodenz and supernatant constituting of a mixture of cells and EPS impossible to collect (data not shown).

To separate cells from EPS before the cell flotation, the sludge was pretreated with a cocktail of enzymes and chelating agents (Figure III-6). The main chelating agents were STPP and PVPP because they reduce the interaction of cell materials with humic compounds. The successively employed enzymes were an α -amylase, a pectinase, a cellulase mix, and a DNase. These enzymes dissolve polysaccharides, complex carbohydrates, cellulose, and DNA, respectively, which are part of the EPS of the sludge. Proteases and lipases were avoided in order to avoid damaging the cell membrane of microorganisms and to preserve their viability. The combination of the enzyme chelating agent pretreatment and the cell flotation allowed the recovery of a clear band containing the cells separated from EPS (Figure III-7).

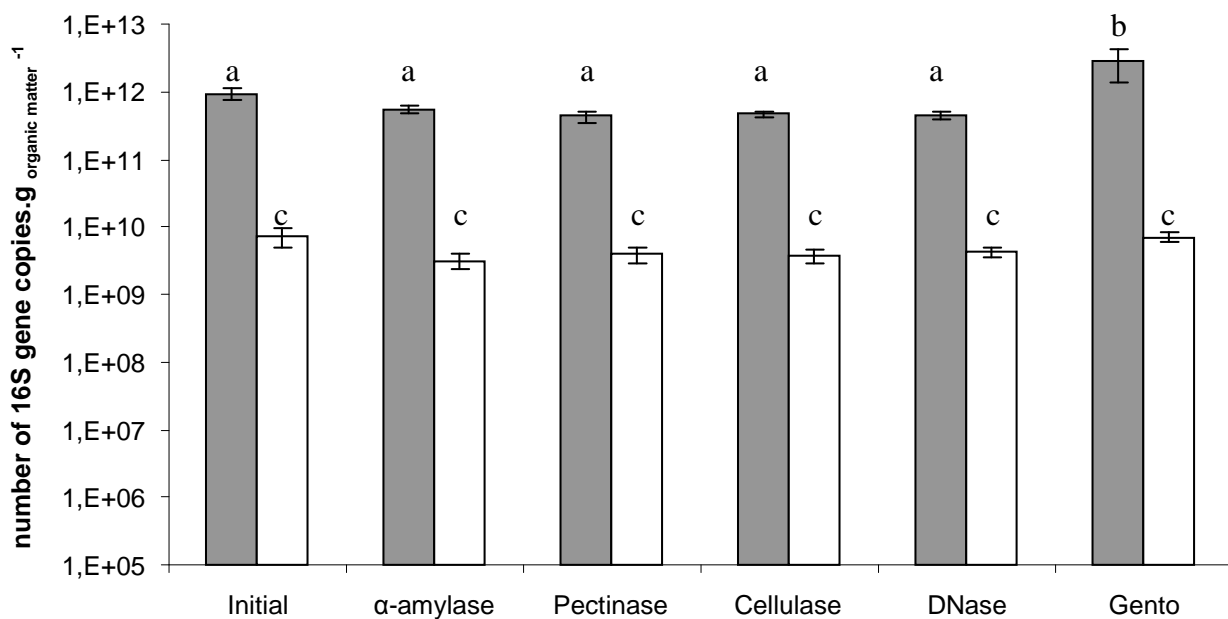


Figure III-8: Numeration of 16S gene copies of *Bacteria* (in grey) and *Archaea* (in white) by quantitative PCR

The used primer sets were BAC338F/BAC805R for the *Bacteria* and ARC787F/ARC1059R for the *Archaea*. The X-axis represents the protocol steps after which the numeration was done. Standard deviations are displayed. The letters above the bars indicate statistical differences between groups.

Effect of the extraction protocol on the abundance of microorganisms.

The influence of the combination of pretreatment and density gradient on the number of *Bacteria* and *Archaea* was determined by Q-PCR. For each step of the protocol, we estimated the concentration of bacterial and archaeal V3 gene copies per gram of organic matter (Figure III-8). The mean numbers of 16S rRNA gene copies were $8.16 \times 10^{11} \pm 1.57 \times 10^{11}$ and $4.87 \times 10^9 \pm 6.07 \times 10^8$ for *Bacteria* and *Archaea*, respectively.

While the methodology did not influence the total number of *Archaea* (ANOVA, $P=0.1005$), significant differences in abundances were found for bacterial communities (ANOVA, $P=0.0004$). Only the Gentodenz step significantly increased the abundance of recovered *Bacteria* (SNK test, $P<0.05$).

The influence of the protocol steps on the *Archaea/Bacteria* ratio was also studied using Q-PCR data (Figure III-9). The ANOVA test revealed a significant difference between the *Archaea/Bacteria* ratios ($P= 0.0067$, $F=3.72$). Indeed, 3 steps differed: DNase/Gentodenz, pectinase/Gentodenz, and DNase/amylase. However, the SNK test showed that the initial step and the final step were not statistically different.

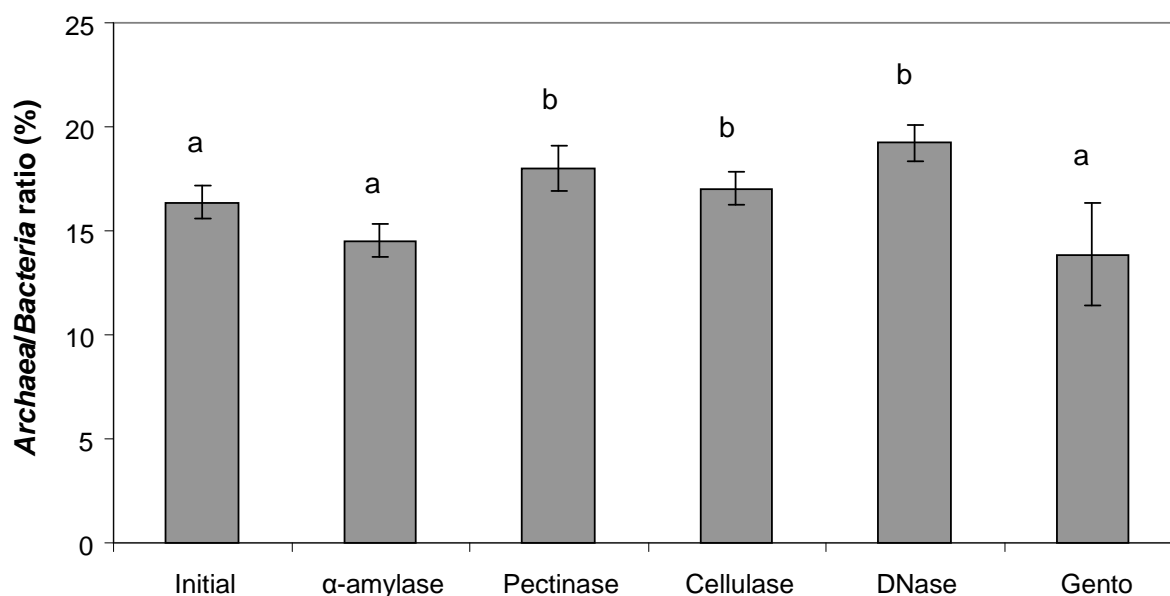


Figure III-9: The *Archaea/Bacteria* ratio with respect to enzyme and Gentodenz steps based on numeration by quantitative PCR

The used primer sets were BAC338F/BAC805R for the *Bacteria* and ARC787F/ARC1059R for the *Archaea*. Standard deviations are displayed. The letters above the bars indicate statistical differences between groups.

Effect of the extraction protocol on the structure and diversity of microbial communities.

The structure and diversity of the bacterial and archaeal communities were examined for each step of the protocol by using CE-SSCP fingerprints. The Euclidean distances between CE-SSCP fingerprints were computed and displayed in dendrograms (Figure III-10). The greatest genetic distance between a pair of CE-SSCP profiles was as low as 0.1, indicating that no clear shift occurred during the protocol. The microbial communities coming from one group of samples could not be statistically distinguished, in particular among the three groups defined, i.e., the initial step, the different enzyme steps, and the cell flotation step (non-significant ANOSIM values). The structure of the microbial communities thus did not vary.

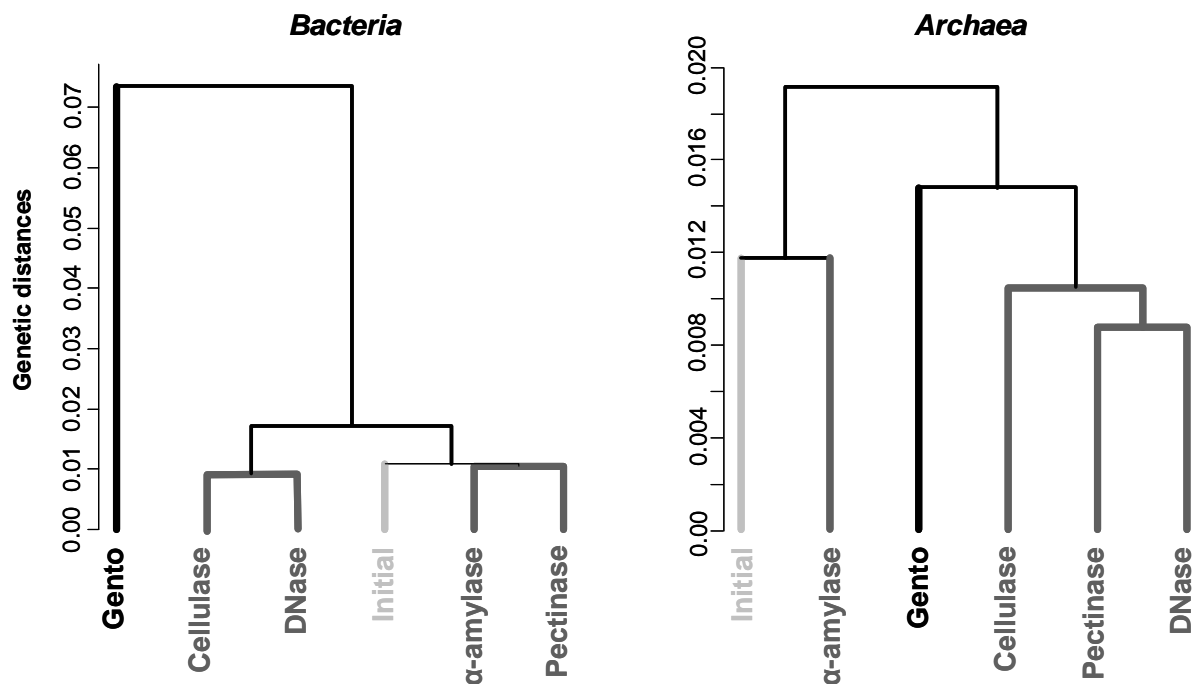


Figure III-10: Dendrograms displaying genetic distances between bacterial and archaeal communities

The dendrograms were obtained using euclidean distances and an average grouping algorithm applied to mean CE-SSCP profiles of DNA fragments amplified using primer sets: W49/W104 (*Bacteria*) and W274/W275 (*Archaea*). The principal steps of the protocol were highlighted differently: group 1: Initial communities (light grey), group 2: Enzymatic steps (grey), and group 3: Final Gentodenz step (black).

The mean Simpson diversity index for the *Archaea* remained stable at around 2.8 all along the protocol. The mean Simpson diversity index for *Bacteria* decreased slightly, from 3.3 to 2.2, but only during the final flotation step (ANOVA, $P=0.001$, $F=10.9$). Whatever the bacterial CE-SSCP profile, all overlapping peaks were present (Fig. 5B). The relative intensity of overlapping peaks corresponding to the relative abundance of bacterial species was influenced by the final flotation step (Figure III-11). This variation of the relative abundance of the bacterial species could induce a disruption in the methanogenic activity. Therefore, we examined whether the activity of microbial communities was not affected by variation in relative abundance.

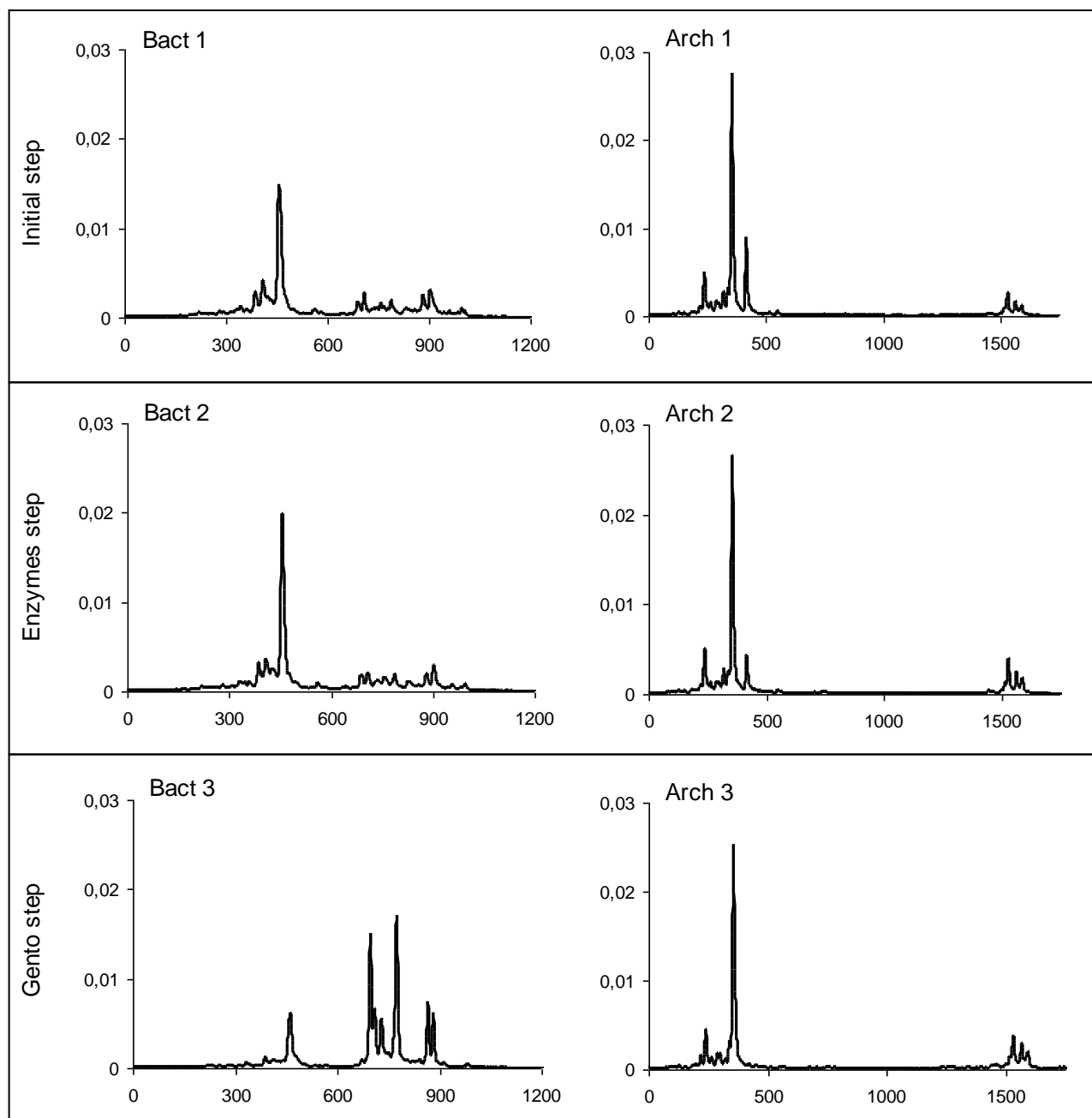


Figure III-11: Mean CE-SSCP profiles of DNA fragments amplified using primer sets: w49/w104 (Bact) and w274/w275 (Arch).

The mean CE-SSCP profiles represent a mean of profiles for each principal step of the protocol. The couples (Bact1/Arch1), (Bact2/Arch2), (Bact3/Arch3) represent the mean profile for initial, enzymatic and Gento steps, respectively. The different CE-SSCP profiles were aligned on the basis of the common ROX internal standard, and the areas were normalized. The X and Y axis of each CE-SSCP profile represent the relative peak migration distance and the relative peak intensity, respectively.

Effect of the extraction protocol on the activity of recovered cells. Monitoring of the dynamics of biogas production in standardized anaerobic incubation experiments revealed a rapid recovery of the fermentative activity of the recovered cells and a preservation of the ability to degrade both substrates (glucose and acetate) (Figure

III-12). The reactions were completed in 12 days. On the one hand, the main gas produced with $1 \text{ g}_{\text{COD}_{\text{glucose}}} \cdot \text{L}^{-1}$ was hydrogen, and we did not detect any methane, in accordance with the incubation conditions used. The presence of hydrogen underscored the presence of active fermentative *Bacteria*. On the other hand, when looking at the incubation experiments with the mixture of glucose and acetate, the main gases produced were CO_2 and CH_4 . The methanogenesis took much more time, but the experiment indicated that the recovered cells also contained active archaeal methanogen populations.

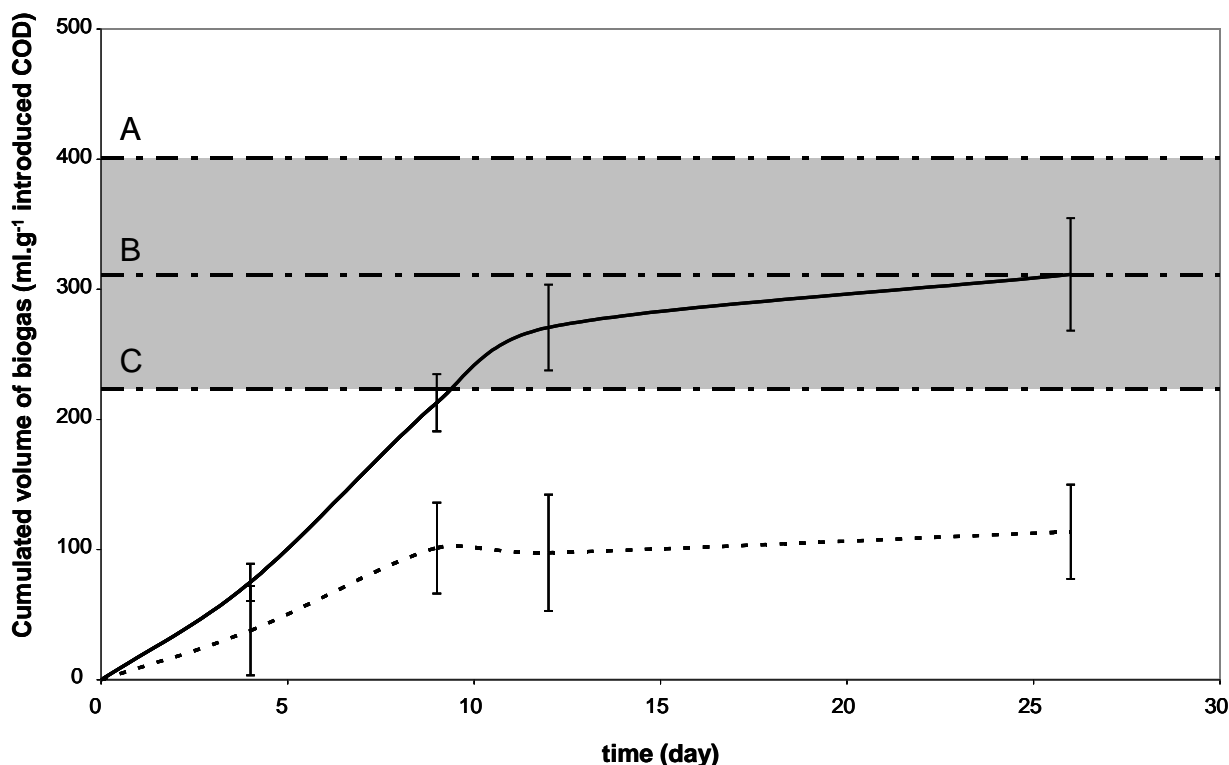


Figure III-12: Biogas production by recovered microbial cells under standard anaerobic test conditions

The recovered cells were incubated with $1 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{l}^{-1}$ glucose (solid line) or $0.5 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{l}^{-1}$ glucose and $0.5 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{l}^{-1}$ acetate (dotted line). The range of expected hydrogen production from a substrate at a concentration of glucose of $1 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{l}^{-1}$ is represented in grey. Literature values for the maximum hydrogen production are represented by three horizontal dash-dotted lines A (Quéméneur et al., 2011), B (Quéméneur et al., 2011), C (Guo et al., 2010).

III.2.4. Discussion

It is challenging to extract microorganisms from an environment, like sludge, where the difference in density between microbial cells and EPS compounds is tenuous. Here, we started with a protocol that had been developed for soils (Barra Caracciolo et al., 2005; Maron et al., 2006; Bertaux et al., 2007) and was also adapted for sediments (Amalfitano and Fazi, 2008). However, cell flotation of sludge samples was impossible whatever the concentration of Gentodenz tested. Some enzymatic pretreatments were thus applied. The pH, the temperature, and the reaction time were optimized for each

enzyme based on an estimation of the sludge composition with respect to polysaccharides, complex carbohydrates, cellulose, and DNA (Simon et al., 2009). The required amount of enzyme was doubled to take into account the partial adsorption of the added enzymes in the sludge (Dey et al. 2006). The workflow that met our requirements (Figure III-6) could be processed in one working day.

Enzymatic pretreatments followed by a gradient extraction allowed the recovery of all microorganisms from the sludge. The mean concentrations of bacterial and archaeal 16S gene copies per gram of organic matter converted per millimeter of sludge (1.6×10^{10} and 1.2×10^7 , respectively) were on the same order as values reported in the literature (between 10^9 and 10^{11} for *Bacteria* and between 10^7 and 2×10^9 for *Archaea*) (Nettmann et al., 2010; Shin et al., 2010). The proposed protocol can be further applied to other complex matrices constituted by bioaggregate or biofilm.

The preservation of the density, quality, and activity of the anaerobic *Archaea*, which had been checked carefully, was a crucial point to preserve the methanogenic capacity of the sludge. Distinguishing 3 groups, we checked whether microbial community structures were affected by the successive enzymatic/physical treatments. According to the tenuous distances between the archaeal SSCP fingerprints (Figure III-10), there were no differences between the communities. The molecular studies underscore that the association of enzymatic pretreatment and density gradient did not affect either the number or the diversity of archaeal communities (Figure III-8).

In contrast, *Bacteria* were slightly affected in terms of abundance (Figure III-11), diversity, and community structure, but only by the final cell flotation step. Previous studies already reported some preferential extraction of specific species of bacteria, like *Gammaproteobacteria*, during cell flotation, while other species, like *Actinomycetes* spp., were less abundant (Courtois et al., 2001). However, the enzymatic pretreatment did not change the representativeness of *Bacteria* compared to the original sludge sample. The differences in abundance and structure of the bacterial community in the Gentodenz step could be explained by a difference in allocation of bacterial species by the Gentodenz protocol.

Even though we observed slight differences in bacterial communities between the final step and the other steps, the *Archaea/ Bacteria* ratios at the initial and final steps were not significantly different. Under methanogenic conditions, the *Archaea/ Bacteria* ratio may vary between 1% (Moletta-Denat et al., 2010) and 20% (Habouzit et al., 2011). The quite high values observed in this study (between 14 and 19%) resulted in a good biogas production potential. The archaeal communities were thus conserved, as were their proportions in the total microorganism community.

One aim of this study was to find a protocol to recover viable microbial communities of sludge to use them as an inoculum in anaerobic methanogenic conditions. The

protocol preserved the overall capability of the microbial community to produce methane under anaerobic conditions (Figure III-12). The differences in biogas production with respect to the type and amount of substrate added may be related to the difference in growth rates of fermentative and methanogenic microorganisms. Adding too much substrate per amount of microorganisms present can favor fermentative pathways that further inhibit the methanogenic activity. Indeed, acidogenic *Bacteria* have much shorter generation times (a few hours) than methanogens (several hours to several days). Under organic overload conditions, the faster metabolism of acidogenic *Bacteria* induced an accumulation of metabolic intermediates, especially hydrogen and volatile fatty acids. These metabolites are known to be inhibitors of acetogenic and methanogenic microorganisms, which can stop methane production (Thiele, 1991).

When $1 \text{ g}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$ was added to extracted cells, methane production was inhibited and hydrogen was produced instead. However, the maximum hydrogen production observed was in line with values reported in the literature for untreated inoculum (Guo et al. 2010; Quéméneur et al. 2011). This indicates that recovered cells were sufficiently active to serve as an inoculum source for anaerobic bioreactors.

The combination of enzymatic pretreatment and density gradient preserved the viability of the cells and did not affect the archaeal communities. On the one hand, the conservation of cell viability ensured their overall metabolic and functional potential; on the other hand, the integrity of the archaeal methanogenic potential was preserved. This new extraction method allowed us to recover viable microorganisms from sludge without affecting the methanogenic activity. Once the cells recovered, they could be reinoculated in a given and characterized environment, and their behavior (diversity, quantity, and activity) could be studied in methanogenic conditions.

Furthermore, the association of enzymatic pretreatment and density gradient allowed recovery of the sludge microbial communities devoid of compounds of their original environment. It is now possible to study microorganism communities of sludge or other complex environmental samples rich in EPS, like inoculum in a “controlled” environment (i.e., an environment with controlled physicochemical characteristics), without disturbing interactions between the cells and their original matrices.

The EPS of sludge or other organic and/or inorganic compounds from complex environmental samples could also interfere with molecular tools (Barra Caracciolo et al., 2005; Bertaux et al., 2007). By decreasing the presence of EPS and other compounds, the presented protocol offers interesting perspectives for optimizing the use of molecular tools for studying of microbial communities of sludge or other complex matrices.

III.3. Conclusion

Le protocole expérimental décrit par l'article précédent a donc été mis en place sur l'échantillon de boue de STEP et a permis de récupérer une communauté microbienne représentative des microorganismes présents initialement dans cette boue. Avec les extraits obtenus sur les échantillons de sol et de sédiment, nous disposons donc des micro-organismes de trois écosystèmes présentant un historique contrasté vis-à-vis des micropolluants.

Ce protocole a par ailleurs été testé sur les échantillons de tourbe, cependant il n'a pas permis de dissocier les microorganismes du reste de l'échantillon comme lors de l'application seule du gradient de Gentodenz. Dans le cas des tourbes, il apparaît clairement dans l'échantillon de nombreux débris végétaux de taille plus ou moins importante mais dont la densité est suffisamment faible pour empêcher toute précipitation. Une piste pour extraire les communautés de la tourbe serait peut-être d'appliquer un pré-traitement mécanique, comme un broyage pour permettre de réduire la taille de ces débris, avec le risque que ce traitement physique endommage la viabilité des cellules.

L'association d'un traitement enzymatique basé sur un cocktail d'enzymes plus adaptée à la tourbe peut, lui aussi, être envisagée notamment en utilisant des cocktails plus adaptés à la dégradation des végétaux. Contrairement à leur caractérisation microbiologique, la caractérisation structurelle des tourbes est mal, voire pas, documentée et les réseaux entre les microorganismes et le reste de la matrice ne sont pas connus ce qui rend le choix du cocktail complexe. Il est généralement admis que la tourbe est constituée d'eau et de cendre à 80-90% et que les 10% restant sont constitués de matière organique (majoritairement de la cellulose et de la lignine). L'emploi de cocktails basés sur des enzymes permettant de dégrader préférentiellement la cellulose ou la lignine (cellulase, xylanase, laccase, manganèse ou lignine peroxydase) paraît une perspective intéressante (Monlau et al., 2011).

Chapitre IV. ETUDE DE LA DEGRADATION DE MICROPOLLUANTS ORGANIQUES PAR 3 INOCULA A MATRICE CONSTANTE

Le but de ce chapitre est d'étudier le devenir des micropolluants organiques au cours de la digestion anaérobie en fonction de l'origine de l'inoculum utilisé, tout autre paramètre égal par ailleurs. Dans un premier temps, nous présentons la méthode de stérilisation choisie pour la boue d'alimentation nous permettant d'obtenir une alimentation stérile et le dopage en micropolluants organiques. Dans un second temps, nous présentons les réacteurs et leur suivi au cours du temps, menés en condition anaérobie mésophile et inoculés avec les différents extraits obtenus suite aux travaux décrits dans le chapitre précédent. Dans cette étude, le substrat est donc constant et bien caractérisé, et le seul paramètre qui a été volontairement modifié est l'origine de la communauté microbienne inoculée.

IV.1. Stérilisation de la boue d'alimentation

Afin de rester le plus proche possible des conditions opératoires de méthaniseurs traitant des boues de station d'épuration des eaux usées urbaines, un substrat complexe a été utilisé. De plus, pour pouvoir étudier l'influence des différentes communautés microbiennes préalablement extraites des écosystèmes d'intérêts, il est primordial que ce substrat qui sert d'alimentation de nos réacteurs soit exempt de microorganismes actifs. Une stratégie de stérilisation de ce substrat-boue servant d'alimentation a donc été mise en place.

IV.1.1. Choix du mode opératoire

Dans la littérature, plusieurs méthodes de stérilisation des boues sont employées, l'utilisation d'agents chimiques, la stérilisation thermique, la stérilisation par rayonnement ionisant.

Différents agents chimiques peuvent être employés comme le formaldéhyde, l'azide de sodium (NaN_3) ou le chlorure de mercure (HgCl_2), pour empêcher l'activité des microorganismes. Ces méthodes ont été écartées dans notre étude car si l'activité des microorganismes endogènes peut être limitée par ces agents, l'activité des microorganismes servant d'inoculum le sera tout autant.

L'utilisation des méthodes thermique ou de rayonnement permet l'emploi de stratégie de ré-inoculation. Les avantages et inconvénients de ces techniques sont résumés dans le Tableau IV-1.

Les rayons gamma ont pour avantage une stérilisation efficace après une seule exposition. Cependant, cette technique a plusieurs inconvénients rédhibitoires. D'une part, la stérilisation est limitée à de petits volumes et elle déstructure fortement la matrice en diminuant la capacité d'échange cationique. D'autre part, sa réalisation au laboratoire est impossible. Au vu des quantités de boue à stériliser et de la complexité de mise en œuvre opératoire de cette méthode, nous avons décidé d'écarter cette méthode de stérilisation.

Reste donc les méthodes thermiques. Deux méthodes sont classiquement employées : par succession de chauffages doux (80°C), par chauffage intensif (121°C).

Un chauffage doux permet l'élimination de bon nombre de bactéries mais cette méthode n'est pas très adaptée à l'élimination des bactéries sporulantes. Par contre, une température de chauffage plus faible permettrait, dans notre cas, de limiter les pertes de composés dopés par volatilisation. L'utilisation de plusieurs cycles de chauffage doux entrecoupés par des périodes d'incubation (pasteurisation) peut permettre d'augmenter le spectre de microorganismes touchés par cette méthode.

Tableau IV-1: Avantages et inconvénients des techniques de stérilisation

Méthode	Avantage	Inconvénients
Autoclave 121°C	Rapidité Facilité de mise en œuvre Efficacité sur tout type de microorganismes	Modification de la structure de la boue (réaction de Maillard, acidification...) Volatilisation éventuelle des micropolluants ajoutés
Chauffage doux (80°C)	Facilité de mise en œuvre Phénomène de Volatilisation limitée	Nécessité de plusieurs cycles Si un cycle, efficacité limitée sur les bactéries sporulantes Déstructuration de la boue
Rayonnement gamma	Survie faible de tout type de microorganismes Phénomènes de volatilisation réduits	Travail sur des petits volumes Déstructuration de la boue Réalisation impossible dans nos locaux

La méthode de stérilisation par chauffage de la boue à 121° à l'autoclave est la plus rapide et la plus facile à mettre en œuvre. Ce type de stérilisation est efficace pour tout type de micro-organismes. Les désavantages de cette méthode sont, (i) le risque de volatiliser les composés ajoutés par dopage et (ii) une possible déstructuration de la matière organique par la réalisation sous l'effet de la chaleur de réactions de Maillard entre protéines et glucides.

Nous n'avons donc retenu que les méthodes basées sur une action thermique comme procédé de stérilisation de la boue. Des essais préliminaires de stérilisation ont été menés sur des échantillons de boues afin de choisir la température de chauffage et le protocole de stérilisation à appliquer à notre boue d'alimentation.

IV.1.2. Test de différents modes de stérilisation

Les méthodes de stérilisation à 80°C et 121°C ont été testées. Pour augmenter l'efficacité de la stérilisation à 80°C, plusieurs protocoles ont été mis en œuvre. Trois paramètres sont étudiés : le nombre de cycle, la durée d'incubation entre chaque cycle et l'ajout ou non de substrat au début de l'incubation.

Les tests de stérilisation sont effectués en duplicat sur un volume de boue dopée de 500 mL. L'ensemble des conditions de stérilisation sont résumées dans le Tableau IV-2.

Après chaque cycle de stérilisation, un test d'activité microbienne (§ II.1.1.4.2) est réalisé à partir de la boue obtenue. Ce test se base sur l'étude du potentiel de production d'hydrogène de la boue. En effet, les bactéries les plus réfractaires à la stérilisation sont les bactéries sporulantes majoritairement du genre *Clostridium* connues pour leur capacité à produire de l'hydrogène. Dans la suite de ce paragraphe, activité microbienne et production d'hydrogène sont donc confondues. Les résultats obtenus sur les lots de boue ayant subi la stérilisation sont comparés à la boue non traitée et à un témoin négatif constitué uniquement par le tampon stérile dans lequel s'effectue le test d'activité microbienne. Les résultats obtenus en fonction des conditions opératoires testées sont présentés dans le Tableau IV-2.

Tableau IV-2: Résultats d'activité microbienne suivant le mode de stérilisation suivi

Nom	Température	Nombre de cycle	Temps d'incubation	Ajout de substrat	Activité microbienne
Boue non traitée	-	-	-	-	+++
Lot 80-A	80°C	1	-	Non	++
Lot 80-B	80°C	1	-	Oui	++
Lot 80-C	80°C	2	1 jour	Non	+
Lot 80-D	80°C	2	2h	Non	+
Lot 80-E	80°C	2	2h	Oui	+
Lot 80-F	80°C	3	1 jour	Non	+
Lot 80-G	80°C	3	2h	Non	+
Lot 80-H	80°C	3	2h	Oui	+
Lot 121	121°C	1	-	Non	Non
Témoin négatif	121°C	1	-	-	Non

Pour tous les modes de stérilisation sauf la stérilisation à 121°C, une activité microbienne est détectée. La plus forte activité microbienne, parmi les lots de boue stérilisée, est mesurée sur les lots n'ayant subi qu'un seul cycle de chauffage à 80°C. Les méthodes de stérilisation à 80°C révèlent des activités différentes suivant le mode opératoire suivi. Les modes opératoires les plus efficaces sont ceux où au moins deux cycles de stérilisation successifs sont appliqués. Dans le but d'éviter des phénomènes de sporulation ou de re-sporulation pendant les phases d'incubation, le temps de cette dernière a été diminué (d'un jour à 2 h) et l'ajout d'un substrat au début de cette phase a été testé. Ni la diminution du temps d'incubation, ni l'ajout de substrat en début d'incubation n'ont d'effet sur les activités microbiennes mesurées. Il est à noter que l'ajout d'un troisième cycle de stérilisation n'entraîne aucune diminution de l'activité microbienne par rapport à celle mesurée pour deux cycles. Multiplier le nombre de cycle, au-delà de deux, s'avère ne pas être une stratégie efficace.

La stérilisation à 121°C est donc le seul mode de stérilisation où aucune activité microbienne n'est mesurée.

Une étude des caractéristiques chimiques de la boue, nous a permis d'appréhender les effets de la stérilisation sur cette dernière. Les caractéristiques des lots de boues 80-A, 80-D, 121, correspondant respectivement aux lots de boues ayant subi un cycle de stérilisation à 80°C, 2 cycles à 80°C et 1 cycle à 121°C (Tableau IV-2) ont été comparées aux caractéristiques de la boue non traitée.

Les concentrations en matière minérale et matière organique ne sont pas modifiées quel que soit le type de stérilisation employée (Figure IV-1).

Il en est de même pour la DCO, les concentrations protéique et glucidique (Figure IV-2, Figure IV-3, Figure IV-4)

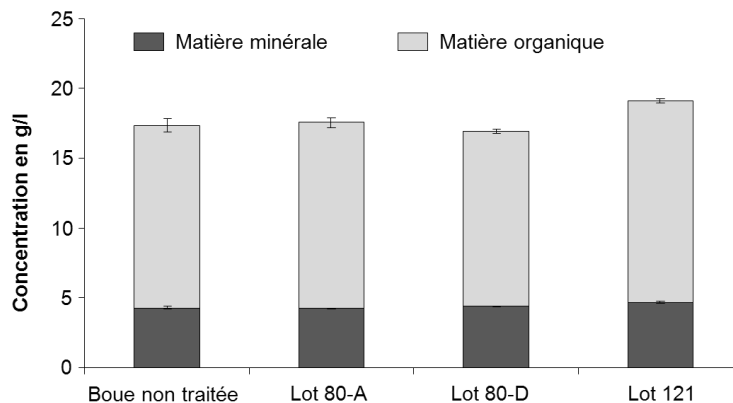


Figure IV-1: Concentration en matière minérale et organique de la boue suivant le mode de stérilisation

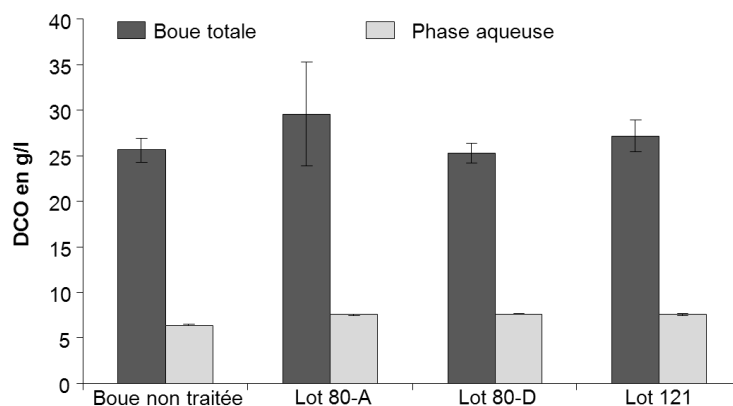


Figure IV-2: DCO de la boue suivant le mode de stérilisation

Par contre, les concentrations protéique et glucidique de la fraction soluble sont différentes entre matrice non stérilisée et matrice stérilisée. La tendance étant à l'augmentation de ces valeurs avec la stérilisation. La variation de la teneur en protéines indique une solubilisation ou dégradation des protéines de plus en plus importante avec la température. De même la solubilisation des sucres augmente par chauffage. Les différences en concentration protéique dans la phase soluble sont très faibles entre un chauffage à 80°C et un chauffage à 121°C (Figure IV-3). Par ailleurs, il n'y a pas de différences significatives entre les méthodes de stérilisation pour la concentration en glucose (Figure IV-4).

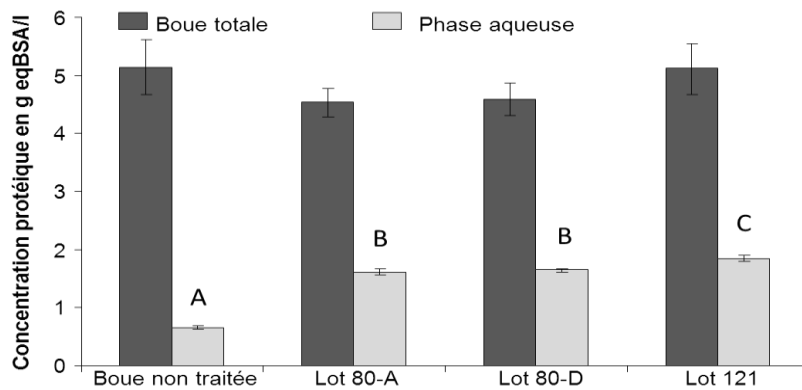


Figure IV-3: Concentrations protéiques de la boue suivant le mode de stérilisation
A, B, C représentent les groupes de valeurs significativement différents

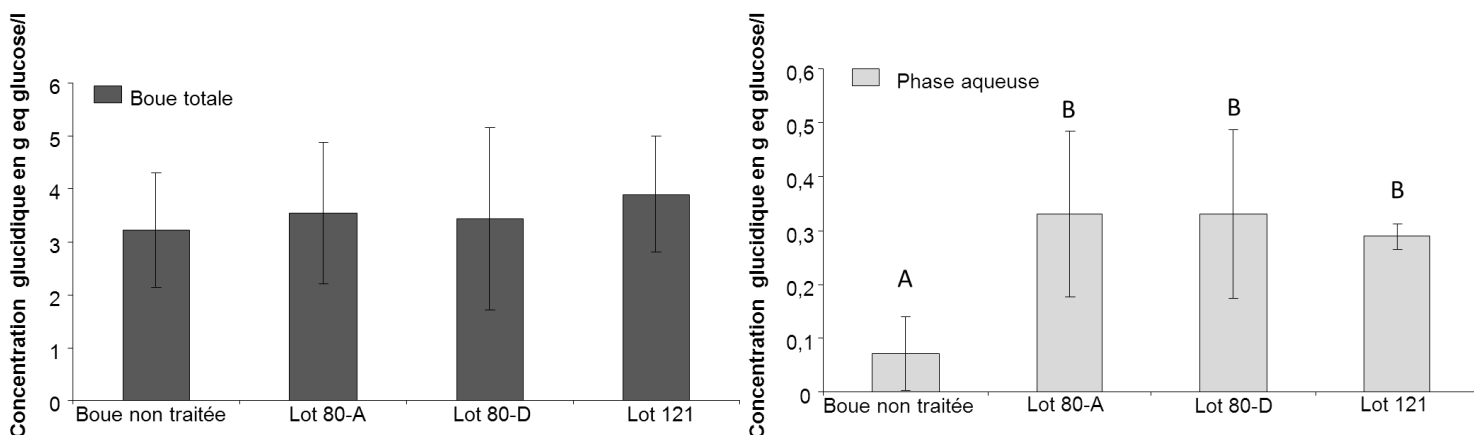


Figure IV-4: Concentrations glucidiques de la boue suivant le mode de stérilisation
A et B représentent les groupes de valeurs significativement différents

Le seul paramètre étudié dont la mesure diffère avec chaque méthode de stérilisation est le pH (Figure IV-5). En effet, le pH diminue quand la température de stérilisation augmente. Cela peut s'expliquer par la libération de composés acides soit par la lyse cellulaire soit par la dégradation de molécules jusqu'à l'obtention de composés acides comme des acides gras volatiles ou acides carboxyliques. L'avantage est que ce paramètre est, contrairement aux autres, facilement ajustable et maîtrisable après coup.

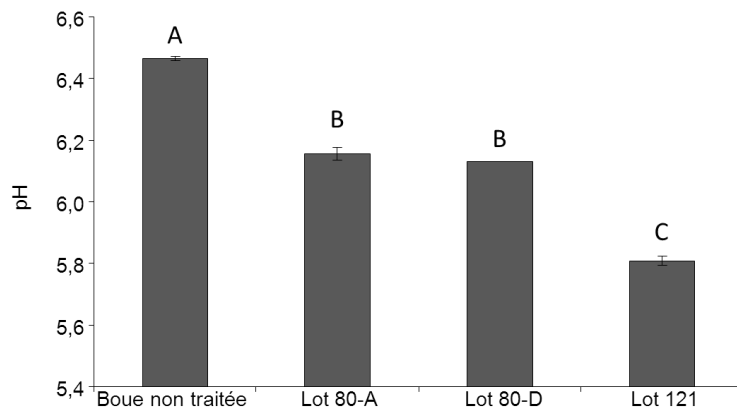


Figure IV-5: pH de la boue suivant le mode de stérilisation

A, B, C représentent les trois groupes de valeurs de pH mesurées significativement différents

L'influence du mode de stérilisation a aussi été évaluée sur la concentration en micropolluants (Figure IV-6). Des mesures en HAP et NP ont été réalisées sur la boue non stérilisée et sur différents lots de boue stérilisée (lots de boues 80-D, 121). Il s'avère que quelle que soit la méthode de stérilisation de la boue, des pertes en composés sont observés. Ces pertes sont attribuées à des phénomènes de volatilisation essentiellement. En effet, les composés les plus volatiles sont touchés alors que les différences de concentration entre boue non stérilisée et boues stérilisées pour les composés les moins volatiles ne sont pas significatives. Les pertes engendrées par la stérilisation ne diffèrent pas selon le mode de stérilisation (si ce n'est pour le nonylphénol). La perte de micropolluant est donc inévitable quelle que soit la méthode de stérilisation thermique choisie.

IV.1.3. Conclusion

Quelle que soit la méthode thermique de stérilisation employée, elle a un impact sur les caractéristiques chimiques de la boue et sur les concentrations en micropolluants. Stériliser notre boue d'alimentation est une nécessité pour la suite de nos expériences. Nous avons donc choisi de réaliser une stérilisation par autoclavage à 121°C car c'est la seule méthode pour laquelle aucune activité microbienne n'a été enregistrée. Un réajustement du pH, une caractérisation de la boue d'alimentation au moment de son usage (après stérilisation congélation et décongélation) et le dosage des micropolluants dans chaque lot de boue d'alimentation utilisé, nous permettra d'appréhender les paramètres de fonctionnement de nos systèmes anaérobies.

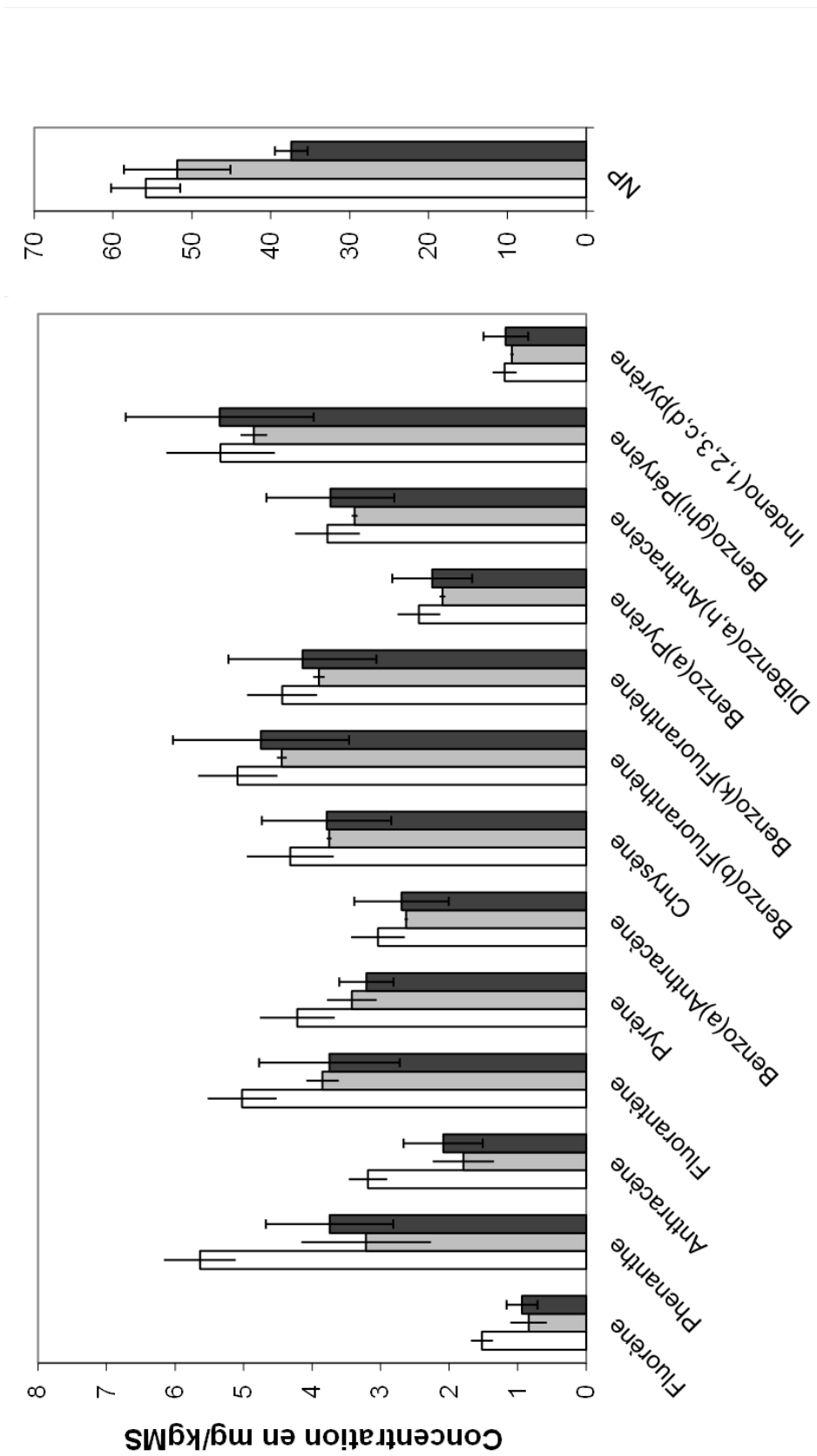


Figure IV-6: Concentration en HAP et NP suivant le mode de stérilisation
 □ Boue non stérilisée, ▒ Boue stérilisée par 2 cycles à 80°C (lot 80-D), ■ Boue stérilisée par 1 cycle à 121°C (Lot 121)

Stériliser la boue d'alimentation d'une part et extraire les microorganismes des écosystèmes d'intérêt d'autre part, nous permet de mettre en place l'étude de l'influence de communautés microbiennes sur la digestion anaérobie et le devenir des micropolluants organiques. Trois types de communautés microbiennes provenant d'un sol contaminé en HAP, d'un sédiment contaminé en PCB et d'une boue urbaine, ont servi d'inoculum à des réacteurs continus anaérobies mésophiles dans lesquels, outre les paramètres de fonctionnement classiques (tels que la dégradation de la matière, la production de biogaz et d'AGV), le devenir des micropolluants et la dynamique des populations microbiennes sont suivis. L'article suivant présente la façon dont les réacteurs ont été menés et les principaux résultats obtenus sur le devenir des HAP et PCB en relation avec la dynamique des communautés microbiennes.

IV.2. Etude de la dégradation des HAP et PCB

SIMILAR MICROPOLLUTANTS FATE IN ANAEROBIC DIGESTERS FED WITH THE SAME SLUDGE BUT EXHIBITING DIFFERENT MICROBIAL POPULATIONS AND METABOLIC ROUTES

Florence Braun, Jérôme Hamelin, Anaïs Bonnafous, Nadine Delgenès, Jean-Philippe Steyer and Dominique Patureau

Article en préparation

Abstract

Urban sludges are often contaminated by organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorobiphenyls (PCB). Biodegradation under methanogenic conditions was already reported but the factors influencing this activity remain unclear. Here, we determined the influence of the microbial community on micropollutants removal under controlled physico-chemical conditions. Twelve mesophilic anaerobic digesters were inoculated with three microbial communities extracted from ecosystems with contrasting pollution histories; a PAH contaminated soil, a PCB contaminated sediment and a low contaminated anaerobic sludge. The digesters were operated during 100 days in continuous mode. A sterilised activated sludge spiked with 13 PAH and 7 PCB at common sludge level was used as substrate. The dry matter and volatile solid degradation, the biogas production rate and composition, and the micropollutants removals were monitored. The bacterial and archaeal communities were compared in abundance (Q-PCR) and in community structure (SSCP fingerprinting). Bioreactors inoculated with the sludge showed a greater methane production. The PAH removals ranged from 5% to 30% depending on the molecules whatever the inoculums tested, and were highly correlated with the dry matter and volatile solid removal. The bacterial and archaeal community structures and

diversity differed with the inoculum source. A relationship between micropollutants removal and matter conversion was highlighted, but no correlation between microbial communities and micropollutants removal was observed. We hence obtained three functional stable consortia with contrasted macroscopic functioning and microbial dynamics, but similar pollutant removals. The removal of persistent organic pollutants depended on the molecule type, but did not depend on the final metabolic pathways of the anaerobic digestion (particularly methanogenic one).

IV.2.1. Introduction

The presence of organic micropollutants in the environment is due to anthropogenic activities. Due to both domestic and industrial practices, organic micropollutants like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorobiphenyls (PCB) are detected at various concentrations in many environments like soil (Thavamani et al., 2012; Turgut et al., 2012), sediment (Chang et al. 2008; Feng et al. 2012; Krumins et al. 2009), water (Mirza et al., 2011; Palmer et al., 2011) and in living organisms (Domingo and Bocio, 2007; Srogi, 2007). These micropollutants are considered as persistent and bioaccumulative compounds and are classified as endocrine disruptors by various environmental agencies (USEPA list). Wasted domestic, industrial and runoff waters converge to the water treatment plant, where PAH and PCB accumulate in the sludge phase (Blanchard et al. 2004), due to the hydrophobic nature of these molecules. There are three main routes in Europe for sewage sludge use (data from 2005): land application as fertilizer (39%), incineration (23%), and landfills (14%). In France, most of the sludge is applied on agricultural land (62%), 28% is incinerated and 15% is stored in the landfills. Different processes can stabilize the sludge, like anaerobic digestion, leading to the degradation of organic matter into biogas (CO₂ and CH₄). Biodegradation was already reported under methanogenic conditions for micropollutants (Patureau & Trably 2006; Trably et al. 2003; Barret et al. 2010b), likewise under other anoxic conditions, i.e. sulfato-reducing or denitrifying conditions (Rockne and Strand, 2001; Musat et al., 2009; Lu et al., 2011).

The potential of degradation relied on the sludge type (Barret et al. 2010a). It can double according to some sludge characteristics, like the fraction of readily biodegradable particles, the concentration of dissolved and colloidal matter. Indeed, the sludge has an impact on the bioavailability (interaction between organic matter and micropollutants) and on the biodegradation potential of the micropollutants without deciding between these two factors. Moreover, this impact is modulated by both organo-mineral composition and activity of the microbial community of the sludge.

In order to understand the role of the microorganisms on PAH and PCB removal, avoiding the effect of the bioavailability, a strategy of extraction/re-seeding was

implemented. By analogy to current practices in applied ecological studies (Tarnawski et al., 2006), the entire microbial communities originating from various environments (soil, sediment and sludge) were extracted with a new developed protocol (Braun et al., 2011) and resettled into microcosms filled with a single well defined sludge matrix.

The molecular fingerprints techniques like denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Muyzer et al., 1993) or single strand conformation polymorphism (SSCP) (Lee et al. 1996) are currently in use to study the diversity of complex ecosystems. These techniques produce molecular fingerprints based on 16S rRNA or functional genes and are useful to compare shifts of population structures in relation with changes in environmental parameters. The advent of automated capillary electrophoresis (CE) equipped with laser induced fluorescence system makes possible carrying out a large number of analysis with an a high sensitivity, reproducibility and throughput (Dumont et al., 2009).

When combining molecular microbial ecology measurements with data about operation and functioning, the resulting dataset is highly multivariable. Statistical multivariate analyses, such as Principal Component Analysis (PCA) is then needed to summarize data and identify molecular fingerprints of putative causal factors of changes in microbial communities among the parameters studied (Ramette, 2007; Talbot et al., 2008).

The aim of this study was thus to determine the role of microbial communities on the anaerobic fate of 7 PCB and 13 PAH present in a single and defined sludge over the time. During 100 days, three series of anaerobic mesophilic reactors inoculated with three microcosms from various pollution histories were fed with a defined, spiked and sterilized sludge. First, the PAH and PCB removals, the production of biogas and the other functioning parameters (volatile fatty acids concentration, chemical oxygen demand reduction) were collected. Second, the characterization of the bacterial and archaeal communities was related to changes in functioning. This is the first report in which a strategy of community transplantation has been applied to investigate and to characterize the microbial potential of anaerobic PAH and PCB removal under the same well-controlled environmental conditions.

IV.2.2. Materials and methods

IV.2.2.1. Chemicals

Thirteen PAH and 7 PCB were mixed to spike the sludge used as reactor feed (Tableau IV-3). All solvents were purchased from J.T.Baker. PAH and PCB powders were obtained from Dr Ehrenstorfer GmbH. Each compound was dissolved in dichloromethane at 2 g.L⁻¹. A spiking mix was then prepared in acetonitrile at 100 mg.L⁻¹ for each PAH and PCB except for indeno(1,2,3,c,d)pyrene (20 mg.L⁻¹). The standard

solution of PAH in acetonitrile at 10 mg.L^{-1} was provided by Dr Ehrenstorfer GmbH. For quantification, the standard solutions were diluted to obtain 6 calibration levels from 10 to $1000 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$. Standards were stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

IV.2.2.2. Reactor inocula and reactor feed preparation

IV.2.2.2.1. Microbial communities used as inoculum

Microorganisms and physico-chemical characteristic of the matrix can together influence the performance of anaerobic reactor. To study the influence of the microbial communities from different environment (in this study: soil, sediment and sludge) on micropollutant removal, without disturbing interactions between the cells and their original matrices, it is essential to extract viable cells of their native matrices. Microbial cells were extracted from three ecosystems with contrasting pollution histories: 10 g of a PAH contaminated soil, 10 g of a PCB contaminated sediment and 10 g of particulate matter of a low contaminated anaerobic sludge. The particulate matter was separated from the total sludge by centrifugation ($10,000 \times \text{g}$, 20 min). The cell extraction was performed according to Braun et al. (2011). The number of viable recovered bacterial cells used as inocula was estimated by quantitative PCR (Q-PCR) and reached 8.28×10^9 (varied from 7.91×10^9 to 1.19×10^{10}).

IV.2.2.2.2. Preparation of the sludge to feed the reactor

An activated sludge was diluted in water to reach a concentration of $20 \text{ g}_{\text{COD}}.\text{L}^{-1}$. Half of this sludge was spiked with the pollutant mix solution at a concentration of $5 \text{ }\mu\text{g.g}_{\text{DM}}^{-1}$ for each PCB and PAH except for indeno(1,2,3,c,d) pyrene ($1 \text{ }\mu\text{g.g}_{\text{DM}}^{-1}$). All sludge fractions, spiked or not, were sterilized at 120°C for 30 min and stored at -20°C . The sludge was thawed overnight at 4°C before use as reactor feed, and pH was adjusted at 7 with a sterilized NaCO_3^- solution at 52 g.L^{-1} . Composite sample were taken from the feeding tank for chemical analyses. Sludge samples were never stored more than a week after thawing.

IV.2.2.3. Experimental setup

Each extracted microbial community served as inoculum for three 400 mL anaerobic reactors (fed with the spiked sludge). A fourth reactor was fed with the non-spiked sludge as negative control. The reactors were magnetically stirred and maintained in mesophilic conditions at 35°C in a culture chamber. Once a day, the pressure generated by the biogas production was recorded and the head space was adjusted at atmospheric pressure. Then, 20 mL of liquid was removed and collected in tanks at 4°C during 10 days before chemical and molecular analyses. The 20 mL of digested sludge were replaced in reactors by the same volume of fresh sludge. The composition of biogas was

measured three times a week (Aceves-Lara et al., 2008). The 12 continuous reactors were thus operated at a hydraulic retention time (HRT) of 20 days and an organic load of $1 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$. The reactors were ran during 5 HRT.

For the start-up, 100 mL of sterilized sludge (at $1 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$) were inoculated with each extracted microbial community. The reactors were conducted in fedbatch (about 100 days, until reaching 400 mL of reaction medium) to allow a gradual increase of the applied load and a progressive adaptation of communities to experimental conditions.

IV.2.2.4. Chemical analyses

The biogas production was measured using differences in pressure. The biogas composition (CH_4 , CO_2 , H_2 , and N_2) was analyzed by gas chromatography (GC-14A, Shimadzu) (Aceves-Lara et al., 2008). The biogas production performances were normalized by the degraded substrate ($\text{mL} \cdot \text{g}_{\text{COD degraded}}^{-1}$). The dry matter (DM, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) was measured by weighing the sample after heating at 105°C during 24 h. Then the volatile solids (VS, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) was measured by weighing the sample after heating at 550°C during 2 h.

The aqueous phase containing the dissolved and colloidal matter (DCM) was separated from total sludge by centrifugation ($10,000 \times g$, 20 min) followed by a filtration at $1.2 \mu\text{m}$ (GF/C filter, Whatman). The chemical oxygen demands (COD) in total sludge (COD_{tot} , $\text{g}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$) and in DCM phase (COD_{DCM} , $\text{g}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$) were determined thanks to Merck Spectroquant kits. The volatile fatty acids (VFA); acetate (C2), Propionate (C3), iso-butyrate (IC4), butyrate (C4), iso-valerate (IC5) and Valerate (C5) were determined in the aqueous phase by gas chromatography (GC800, Fisons Instruments).

Every 10 days, the accelerated solvent extractions of PAH and PCBs were performed, on duplicate, on freeze-dried samples of the feeding and outlet total sludge according to Trably et al. (2004). PAH were quantified, for each extract, in duplicates, by high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection (Trably et al. 2004). The PAH were grouped according to their molecular weight (MW) (Tableau IV-3).

The PAH with a $\text{MW} \leq 200 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ were qualified as low molecular weight PAH (LMW-PAH), those with $200 < \text{PAH} \leq 250$ as medium molecular weight PAH (MMW-PAH) and those with $\text{MW} > 250$ as high molecular weight PAH (HMW-PAH). After purification, PCB were quantified by gas chromatography coupled to an electron capture detector equipped with a capillary column, according to the norm XP X33-012, with a limit of quantification at $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{DM}}$ (Patureau & Trably 2006).

IV.2.2.5. Removal rate calculation

The comparison of the feed and output reactors parameters determines the removal rate of DM, VS or micropollutants. For the DM and VS, the average removal rates were calculated at steady state on three ½ HRT (3 values). For each PAH, at each HRT, we calculated an average removal rate with a minimum of 12 values by inoculum (4 values by reactor). At steady state we calculated an average removal rate on three ½ HRT, so with a minimum of 36 values. For the PCB, we calculated an average removal at steady state, with 3 values by inoculum.

Tableau IV-3: Physicochemical characteristics of PAHs and PCBs

nC: number of carbon ring, *LMW*: Low Molecular Weight, *MMW*: Medium Molecular Weight, *HMW*: High Molecular Weight

Compound	MW g.mol ⁻¹	nC	PAH category
Fluorene	166	3	LMW
Phenanthrene	178	3	
Anthracene	178	3	
Fluoranthene	202	4	MMW
Pyrene	202	4	
Benzo(a)anthracene	228	4	
Chrysene	228	4	
Benzo(b)fluoranthene	252	5	HMW
Benzo(k)fluoranthene	252	5	
Benzo(a)pyrene	252	5	
Dibenzo(a,h)anthracene	278	5	
Benzo(g,h,i)perylene	278	5	
Indeno(1,2,3,c,d)pyrene	278	5	
PCB 28	257	2	
PCB 52	292	2	
PCB101	327	2	
PCB 118	327	2	
PCB 138	364	2	
PCB 153	364	2	
PCB 180	399	2	

IV.2.2.6. Molecular analyses

The microbial communities were analyzed early in the experiment (HRT 1) and for the three last HRTs (HRT 3, 4 and 5). The structure of the *Bacteria* and *Archaea* was analyzed after DNA extraction, PCR amplification and separation by Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP). Quantitative PCR (Q-PCR) was used to quantify the number of *Bacteria* and *Archaea*.

IV.2.2.6.1. DNA extraction

One mL of sludge sample was first centrifuged for 10 min at 10,000 × g and the pellet was resuspended by vortexing in 385 µL of 4 M guanidine thiocyanate-tris-HCl pH 7.5 0.1 M and 115 µL of 10% (w/v) N-lauroyl-sarcosine (N-LS). The homogenous sample (500 µL) was stored at -20°C before DNA extraction according to the procedure

described by Godon et al. (1997). The DNA concentrations were quantified by spectrophotometry using the Infinite 200 PRO NanoQuant (Tecan, France).

IV.2.2.6.2. *Polymerase chain reaction (PCR) amplification*

To analyze the structure of the bacterial and archaeal communities, the V3 region of the 16S rRNA gene was amplified. The primers W49F and W104R were used for the *Bacteria* (Zumstein et al. 2000) and W274R and W275F for the *Archaea* (Braun et al., 2011).

For the amplification of bacterial sequences, the PCR mixture contained 5 µL of 10X *Pfu* Turbo buffer, 200 nM deoxynucleoside triphosphates (dNTP), 400 nM of each primer, 1.25 U of *Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA), 1 µL of genomic DNA, and water added to obtain a final volume of 50 µL. The PCR conditions were an initial denaturing step of 2 min at 94°C; 25 cycles of a three-stage program of 30 s at 94°C, 30 s at 61°C, and 30 s at 72°C; and a final elongation for 10 min at 72°C.

For the amplification of archaeal sequences, the PCR mixture contained 2.5 µL of 10X *Pfu* Turbo buffer, 200 nM dNTP, 500 nM of each primer, 0.625 U of *Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA), 0.5 µL of genomic DNA, and water added to obtain a final volume of 25 µL. The PCR conditions were an initial denaturing step of 2 min at 94°C; 30 cycles of a three-stage program of 30 s at 94°C, 30 s at 65°C, and 30 s at 72°C; and a final elongation for 10 min at 72°C. All reactions were stopped by cooling the mixture to 4°C.

IV.2.2.6.3. *Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP)*

The resulting PCR products were then separated by CE-SSCP that allows the separation of DNA fragments of the same size but with a different composition (Sen et al., 2008). One µL of diluted PCR products was added to 18 µL of formamide and 1 µL of internal size standard Rox 400 HD (Applied Biosystems, California, USA) diluted 10 times. Each sample was then denatured (5 min at 94°C) and placed directly on ice for 5 min. CE-SSCP was performed using an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) equipped with four 50 cm capillary tubes filled with 5.6% of conformation analysis polymer (Applied Biosystems) in the corresponding buffer and 10% glycerol. The injection of DNA in capillaries required 5 kV during 3 s. Electrophoresis was carried out at 15 kV and 32°C for about 30 min per sample.

IV.2.2.6.4. *Quantitative PCR (q-PCR)*

PCR reactions were prepared using 96-wells real-time PCR plates (Eppendorf Hamburg, Germany) and a Mastercycler ep gradient S (Eppendorf Hamburg, Germany).

12.5 µL of Express qPCR Supermix with premixed ROX (Invitrogen , France), 5 µL of DNA extracts with three appropriate dilutions, 200 nM of the forward and reverse primers (Braun et al., 2011), 50 nM of the TaqMan probe, and water were added to obtain a final volume of 25 µL for all analyses.

An initial incubation of 20 s at 95°C and 40 cycles of denaturation (95°C, 15 s; 60°C, 1 min) were performed. One standard curve was generated at each assay, using 10-fold dilutions in sterilized water (Aguettant Laboratory, Lyon, France) of PCR products from known environmental clones. Clones DF10 and LC103 (Snell-Castro et al., 2005) were used as standards for *Archaea* and *Bacteria*, respectively. One measurement at two or three dilution was obtained per sample for each primer set.

IV.2.2.7. Statistical analyses

All statistical analyses were done with R version 2.11.1 program (R. Development Core Team, 2010). Differences in bacterial and archaeal densities over the time and between inocula were determined with an analysis of variance (ANOVA) and a Student Newman Keuls test (SNK). The SNK test was investigated using the `snk` function of the `Rmutoss` library (MuToss coding Team. 2010).

The CE-SSCP profiles were aligned with the internal standard ROX to correct any change in the electrophoretic motility between runs. The sum of the peak areas were normalized to unity before statistical analyses. The peak areas were determined using a rolling-ball algorithm. The Simpson diversity index (D) was computed for each fingerprinting profile by the formula $D = -\ln \sum (\text{peak areas})^2$, using the implementation of the `R StatFingerprints` library (Michelland et al., 2009). The Euclidean distance was used as a measure of the genetic distances between communities. Changes in genetic structure were displayed using principal component analysis (PCA). The correlations between key reactor functioning parameters and fingerprinting profiles of the bacterial and archaeal communities was investigated using the `envfit` function of the `R vegan` library (Oksanen et al., 2010).

IV.2.3. Results

IV.2.3.1. Anaerobic reactor performances

The performances of the anaerobic reactors were estimated using the following parameters: dry matter (DM) and volatile solids (VS) concentrations, chemical oxygen demand (COD), concentration and composition of biogas, pH and volatile fatty acids (VFA) concentrations. Functional steady states, based on organic matter degradation, were observed after 4 hydraulic retention times (HRT). The performance parameters of the spiked triplicate reactors and the control non-spiked reactor for each inoculum at steady state were presented in Tableau IV-4.

Tableau IV-4: Anaerobic parameters of the mesophilic bioreactors inoculated with the three microbial populations at steady state

COD_{tot} is measured on the total sample and COD_{DCM} on the DCM fraction. COD^* : degraded COD, nd: not detectable. The VFA_{tot} is the total concentration of the VFA measured on the DCM fraction. The different parameters were averaged on two HRT at steady state.

Spiking	Reactor	DM $g.L^{-1}$	VS $g.kg^{-1}$	CO ₂ %	CH ₄ %	CH ₄ $mL.g_{COD}^{-1}$	COD _{tot} $g_{O_2}.L^{-1}$	COD _{DCM} $g_{O_2}.L^{-1}$	pH	VFA _{tot} $g_{eqCOD}.L^{-1}$	Acetate %	Propionate %	i-Butyrate %	Butyrate %	i-Valerate %	Valerate %
yes	Soil 1	14.8 ±0.2	10.0 ±0.2	54 ±2	46 ±2	85.2 ±45.9	24.3 ±1.1	8.6 ±0.2	5.7 ±0.1	6.6 ±0.2	57 ±0	19 ±2	3 ±0	15 ±2	5 ±0	2 ±0
yes	Soil 2	14.5 ±0.1	9.8 ±0.2	52 ±1	48 ±1	76.5 ±32.6	23.4 ±0.3	8.6 ±0.2	5.6 ±0.1	6.8 ±0.1	59 ±2	19 ±1	3 ±0	13 ±1	5 ±0	1 ±0
yes	Soil 3	14.4 ±0.3	9.7 ±0.3	59 ±5	40 ±6	71.0 ±37.5	24.7 ±0.8	8.9 ±0.1	5.8 ±0.1	6.6 ±0.3	54 ±1	19 ±0	2 ±1	18 ±0.	4 ±1	2 ±0
no	Soil control	14.5 ±0.5	9.6 ±0.3	55 ±1	45 ±1.	57.8 ±13.8	22.8 ±2.6	7.4 ±0.4	5.9 ±0.1	7.3 ±1.1	54 ±5	20 ±2	3 ±0	10 ±1	5 ±0	7 ±8
yes	Sediment 1	14.8 ±0.1	10.0 ±0.1	54 ±1	46 ±1	118.6 ±45.6	24.5 ±0.9	8.5 ±0.3	5.5 ±0.1	6.8 ±0.1	59 ±1	18 ±1	2 ±0	15 ±1	4 ±0	1 ±0
yes	Sediment 2	14.5 ±0.3	9.7 ±0.3	37 ±9	63 ±9	187.0 ±105.9	24.5 ±0.7	7.4 ±1.7	6.4 ±1.0	5.6 ±1.7	42 ±18	28 ±13	3 ±2	18 ±1	6 ±3	2 ±1
yes	Sediment 3	13.9 ±0.6	9.3 ±0.6	21 ±9	79 ±9	322.8 ±114.1	19.6 ±2.9	4.7 ±1.0	8.1 ±0.1	3.3 ±0.7	9 ±5	61 ±14	7 ±2	8 ±12	13 ±3	1 ±2
no	Sediment control	14.5 ±0.5	9.6 ±0.3	36 ±3	64 ±3	270.5 ±107.5	22.4 ±0.7	4.5 ±0.1	7.9 ±0.1	4.1 ±0.4	16 ±8	45 ±6	6 ±1	20 ±0	10 ±1	3 ±1
yes	Sludge 1	14.4 ±0.5	9.7 ±0.4	22 ±1	78 ±1	424.5 ±67.1	20.7 ±1.3	2.7 ±0.5	8.1 ±0.1	1.3 ±2.7	9 ±2	46 ±19	21 8,00	nd	24 ±9	nd
yes	Sludge 2	14.9 ±0.2	10.0 ±0.2	24 ±2	76 ±2	341.6 ±95.4	20.5 ±1.7	4.1 ±0.2	8.2 ±0.1	2.7 ±0.1	18 ±6	58 ±4	9 ±	nd	15 ±1	nd
yes	Sludge 3	14.2 ±0.4	9.5 ±0.3	22 ±1	78 ±1	366.4 ±92.0	18.7 ±0.6	2.3 ±0.4	8.1 ±0.1	1.0 ±0.4	12 ±5	32 ±30	26 ±12	nd	30 ±14	nd
no	Sludge control	13.7 ±0.5	8.6 ±0.4	28 ±3	72 ±3	295.1 ±62.2	15.5 ±0.7	1.6 ±0.1	8.0 ±0.1	0.6 ±0.3	21 ±7	30 ±25	2 ±3	nd	47 ±21	nd
yes	Feed sludge	16.3 ±0.5	12.9 ±0.2				26.4 ±1.1		7.0 ±0.2	3.3 ±0.4	54 ±4	24 ±2	1 ±0	15 ±1	2 ±1	3 ±0
no	Feed sludge control	16.5 ±1.4	11.8 ±1.0				27.3 ±4.7		7.0 ±0.2	3.4 ±0.5	53 ±5	25 ±2	1 ±0	15 ±1	2 ±1	3 ±0

CH₄ concentrations in the spiked reactors were compared to the non-spiked control reactors. Reactors inoculated with the sludge produced more CH₄ than their negative controls; those inoculated with the soil slightly more and those inoculated with the sediment were similar. The spiking had however no impact on the other functional parameters. The influence of the origin of the inoculum on the DM and VS removal of the spiked reactor was also studied. Regardless of the inoculum, the dry matter removal rate was similar around 12 ±2%.

The average methane concentration differed from one inoculum to another (ANOVA, P<0.001). The lowest methane concentrations were measured for the reactors inoculated with soil microorganisms (69.4 ±37.3 mL.gCOD degraded⁻¹) and the highest for the reactors inoculated with sludge microorganisms (344.8 ±86.9 mL.gCOD degraded⁻¹). For the sediment inoculum, the measured concentrations were more heterogeneous from one reactor to another (with methane concentration varying from 97.0 ±37.1 to 303.2 ±107.2 mL.gCOD degraded⁻¹).

The pH differed also according to the inocula, with an increasing pH for soil, sediment and sludge inoculum (Tableau IV-4). By contrast, the VFA concentration decreased for soil, sediment and sludge inoculum (from 6.6 ±0.2 g_{eq}COD.L⁻¹ for soil triplicate to 1.7 ±0.9 g_{eq}COD.L⁻¹ for sludge triplicate).

Apart from the degradation of DM that is identical regardless of the reactor, the study of macroscopic operating parameters such as VFA concentration, biogas production and pH, revealed differences depending on the origin of the studied inoculum.

IV.2.3.1. PAH and PCB removals

The PAH and PCB removal efficiencies of each inoculum were studied at steady state (Figure IV-7) but also over the time (Figure IV-8).

At steady state and regardless of the inoculum (Figure IV-7), the PAH removals were low and decreased from 30% to 5% with the increase of the molecular weight of the PAH considered (ANOVA, P<0.001). PAH removals were similar between the inocula when considering only the low molecular weight (LMW-PAH) (ANOVA, P=0.059) and in the high molecular weight (HMW-PAH) (ANOVA, P=0.814) categories. For medium molecular weight MMW-PAH category, the soil inoculum displayed the lowest removal (SNK test, P<0.05).

The fate of PCB180 was only considered as a result and an average PCB removal of the 7 PCB molecules (Figure IV-7). The removal of PCB 180 was the same whatever the inoculum.

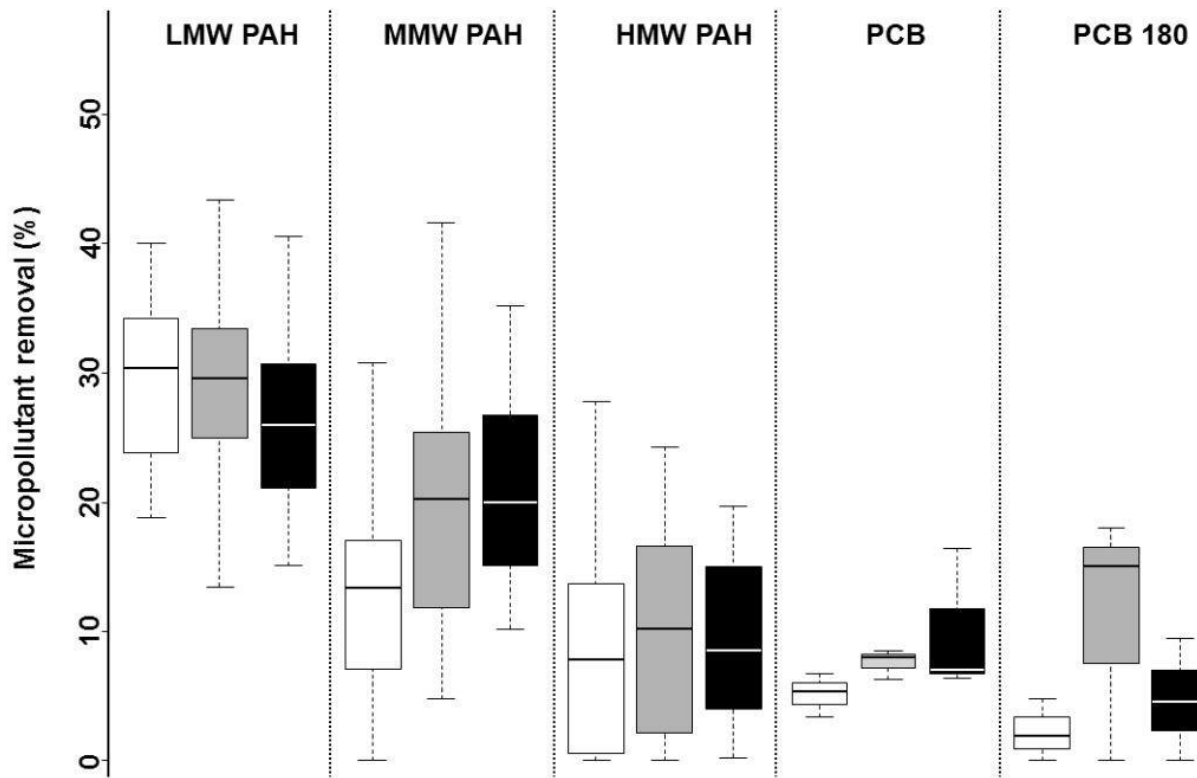


Figure IV-7: Boxplot of the anaerobic pollutants removal at steady state according to the inocula

The removals for the soil inoculum (white), sediment inoculum (grey) and sludge inoculum (black) were measured at steady state. The LMW-PAH, the MMW-PAH and the HMW-PAH are defined in table 1. The box shows 75th percentiles (top line), 50th percentile (middle line) and 25th percentile (bottom line).

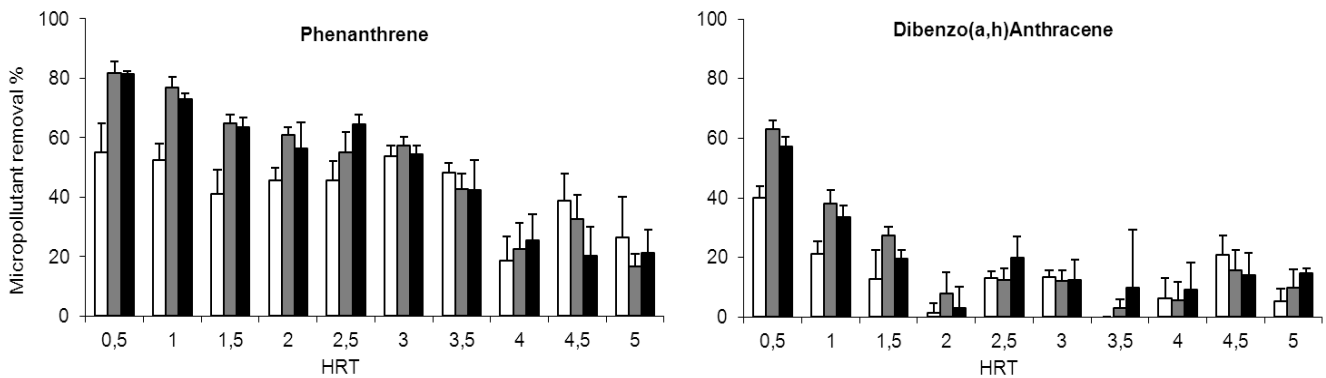


Figure IV-8: Representation of PAH fate over the time according to the inoculum

Phenanthrene is a representant of the LMW-PAH and Dibenzo(a,h)Anthracene of the HMM-PAH. The performance of the soil, sediment and sludge inoculum were respectively in white, light grey and dark grey.

At the initial state (HRT 0), the PAH removals differed according to the inoculum (Figure IV-8). The PAH removal was higher in the reactor inoculated with sediment and sludge. For all the PAH molecular weight categories, the PAH removals converged over the time to similar value whatever the inoculum. The DM and VS removal were correlated with the PAH removal ($cor_{DM}=0.580$, $cor_{VS}=0.568$). These correlations were even stronger for the highest molecular weight (with $cor_{DM}=0.445$, $cor_{VS}=0.445$ for the

LMW-PAH, $cor_{DM}=0.614$, $cor_{VS}=0.602$ for the MMW-PAH and $cor_{DM}=0.639$, $cor_{VS}=0.613$ for the HMW-PAH).

At steady state, the PAH removal depended on the characteristics of the molecule but not on the origin of the inoculum. This could have been due to the selection of similar communities in the designed experiment for bioreactors inoculated with the three different origins. The abundance and the diversity of the bacterial and the archaeal populations were when checked.

IV.2.3.2. Changes in abundances of microorganisms

The abundance of microorganisms was examined by Q-PCR for each inoculum origin at HRT0, HRT3 and at steady-state (Figure IV-9). Before any comparison between experimental conditions, we checked if spiking with micropollutants had no effect on *Bacteria* (ANOVA; for the soil $P=0.609$, the sediment $P=0.521$ and the sludge $P=0.844$). A slight effect was observed for *Archaea* in the reactors inoculated with soil and sludge (ANOVA; $P<0.001$). At steady state, the mean concentration of *Bacteria* per gram of organic matter was 5.63×10^{11} ($\pm 6.25 \times 10^{10}$) for the soil inoculum, 8.99×10^{11} ($\pm 1.40 \times 10^{11}$) for the sediment inoculum and slightly higher with 1.31×10^{12} ($\pm 7.85 \times 10^{10}$) for the sludge inoculum. The archaeal average densities on the triplicated reactors increased according to the inoculum with 7.72×10^9 ($\pm 1.00 \times 10^9$) for the soil, 2.77×10^{10} ($\pm 8.76 \times 10^9$) for the sediment and 7.80×10^{10} ($\pm 8.90 \times 10^9$) for the sludge.

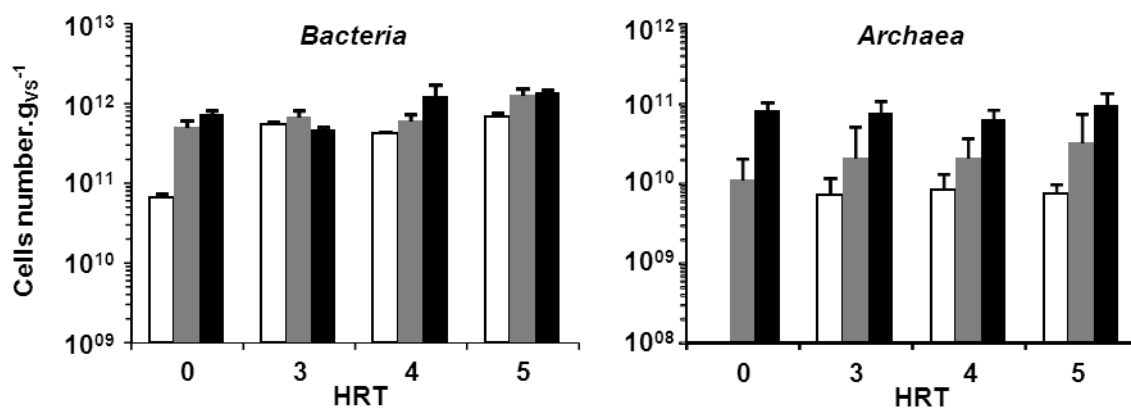


Figure IV-9: Enumeration of *Bacteria* (in left) and *Archaea* (in right) by Q-PCR.

The x axis represents the hydraulic retention time. Standard errors are displayed. HRT4 and HRT 5 represent the steady state

The density of *Bacteria* increased over time (ANOVA, $P<0.001$) for the reactors inoculated with the soil from 6.46×10^{10} ($\pm 8.73 \times 10^9$) to 5.63×10^{11} ($\pm 6.25 \times 10^{10}$). The density of *Bacteria* also increased over time (ANOVA, $P<0.001$) for the reactors inoculated with the sludge from 7.39×10^{11} ($\pm 7.70 \times 10^{10}$) to 1.31×10^{12} ($\pm 7.85 \times 10^{10}$). The density of *Bacteria* remained stable over time (ANOVA, $P=0.05$) for the reactors inoculated with the sediment at around 7.56×10^{11} ($\pm 8.98 \times 10^{10}$). The dynamics of

archaeal concentrations varied depending on the inoculum. The *Archaea* quantity increased in reactors inoculated with the soil from below the detection limit to 7.72×10^9 ($\pm 1.00 \times 10^9$). By contrast, the quantity of *Archaea* were similar between initial and final time (SNK, $P < 0.05$) for the reactors inoculated with the sediment with 2.48×10^{10} ($\pm 7.43 \times 10^9$) and the reactors inoculated with the sludge with 7.88×10^{10} ($\pm 5.42 \times 10^9$).

The microbial densities either increased or remained stable, over time, until reaching a steady state after three HRT.

IV.2.3.3. Microbial community diversity and structure

The structure and the diversity of the microbial communities were examined for each of the twelve reactors over the time by using CE-SSCP fingerprints. The resulting Simpson diversity index for *Bacteria* varied over the time depending on the inoculum. The bacterial Simpson diversity index decreased from 3.0 to 1.9 for the reactors inoculated with the soil, whereas it increased from 2.7 to 3.2 for the reactors inoculated with the sludge and was stable at around 2.3 for the reactors inoculated with the sediment. The mean Simpson diversity index for *Archaea* at steady state in reactors inoculated with the soil was around 2.5. The archaeal Simpson diversity index decreased from 3.1 to 2.4 in reactors inoculated with the sediment and increased from 2.6 to 3.3 in reactors inoculated with the sludge. At steady-state, the diversity of bacterial and archaeal communities of reactors inoculated with sludge was higher than for the other reactors (Figure IV-10). At steady state, each inoculum still retained its own diversity albeit operating conditions were maintained similar for all the bioreactors for 100 days. The changes in diversity were computed using Principal Component Analysis (PCA) ordinations. These changes were neither correlated with dry matter nor PAH removal, but were correlated with the percentage of methane in biogas ($\text{cor} = 0.393$, $P = 0.005$) or with the VFA concentration ($\text{cor} = -0.678$, $P < 0.001$).

By the help of PCA ordination, 58.4% of the genetic differences between samples could be displayed in the two first principal component of the statistical analysis for the *Bacteria* and up to 76.4% the genetic differences for the *Archaea*. These changes in bacterial genetic structure were weakly correlated with PCB 180 removal ($r^2 = 0.253$, $P = 0.045$) and mean PCB removal ($r^2 = 0.308$, $P = 0.21$). No significant correlation could be found between the changes in archaeal genetic structure and the PCB removal parameters.

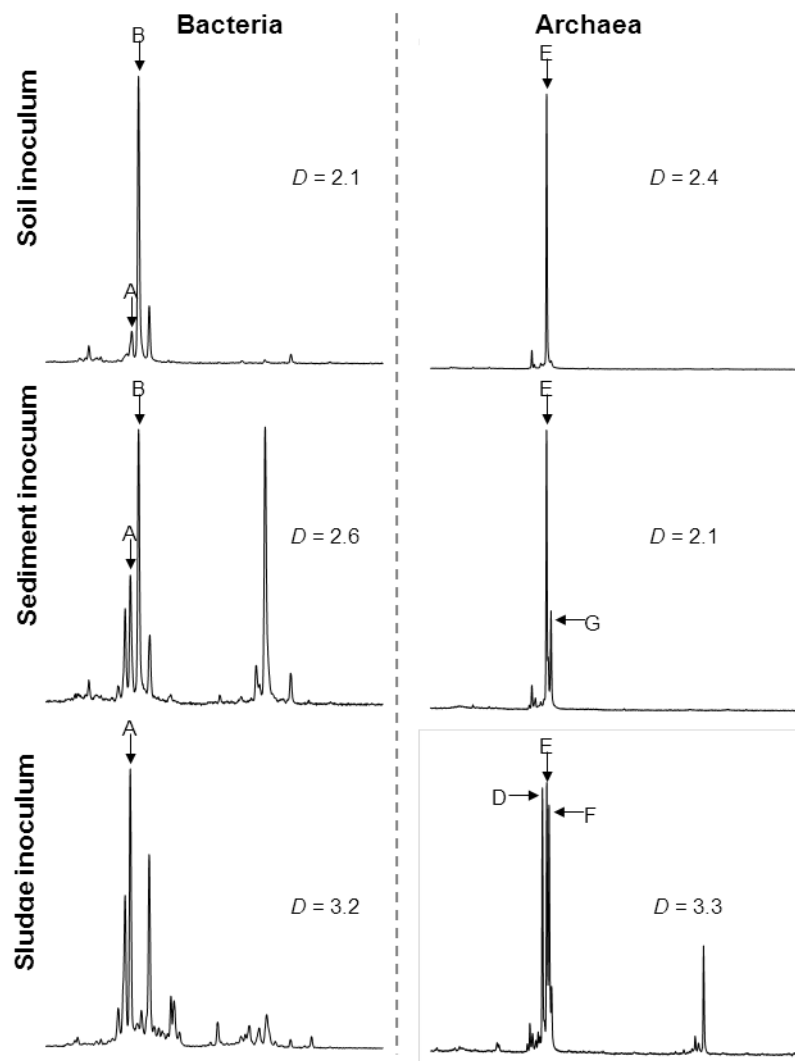


Figure IV-10: Representative of bacterial (on the left) and archaeal (on the right) community CE-SSCP fingerprint based on triplicate reactor at steady state

Same population were represented by the same peak and the relative abundance of the population is proportional to the peak height. D = Simpson diversity index. The dominant peak of microbial communities were represented with a letter from A to F

The Figure IV-11 and Figure IV-12 display shifts in community structures according to the inoculum source and to the sampling time during the experiment. The PCA displayed 65.4% of the genetic differences on the two first principal components when comparing bacterial CE-SSCP fingerprints and 74.3% of the genetic differences when comparing archaeal CE-SSCP fingerprints. The design of the experiment allowed deciphering the role of the inoculum source on the pollutants removal. Here, both bacterial ($P < 0.001$, $r^2 = 0.245$) and archaeal ($P < 0.001$, $r^2 = 0.351$) community structures could be discriminated according to the inoculum source (Figure IV-11).

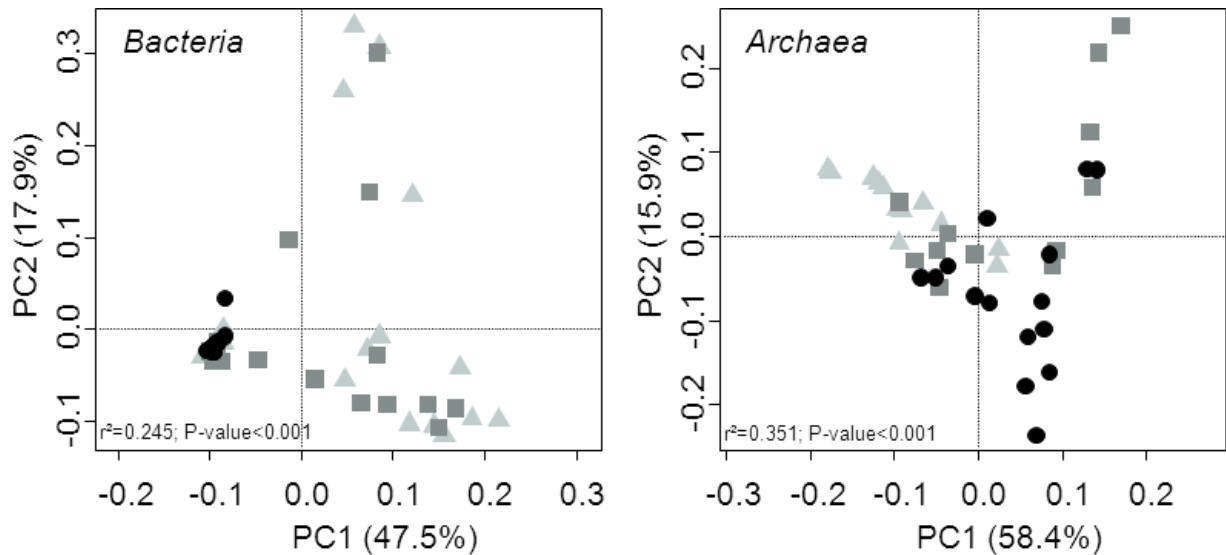


Figure IV-11: Influence of the inoculum origin (soil ▲ , sediment ■ , sludge ●) on the difference in genetic structure of bacterial (on the left) and archaeal (on the right) communities through a PCA.

The percentage variation explained by each principal component and the principal component scores of the sample are plotted on their respective axes.

The discrimination of the bacterial ($P=0.02$, $r^2=0.369$) and the archaeal ($P=0.01$, $r^2=0.428$) communities were improved when the duration of the experiment was also considered (Figure IV-12).

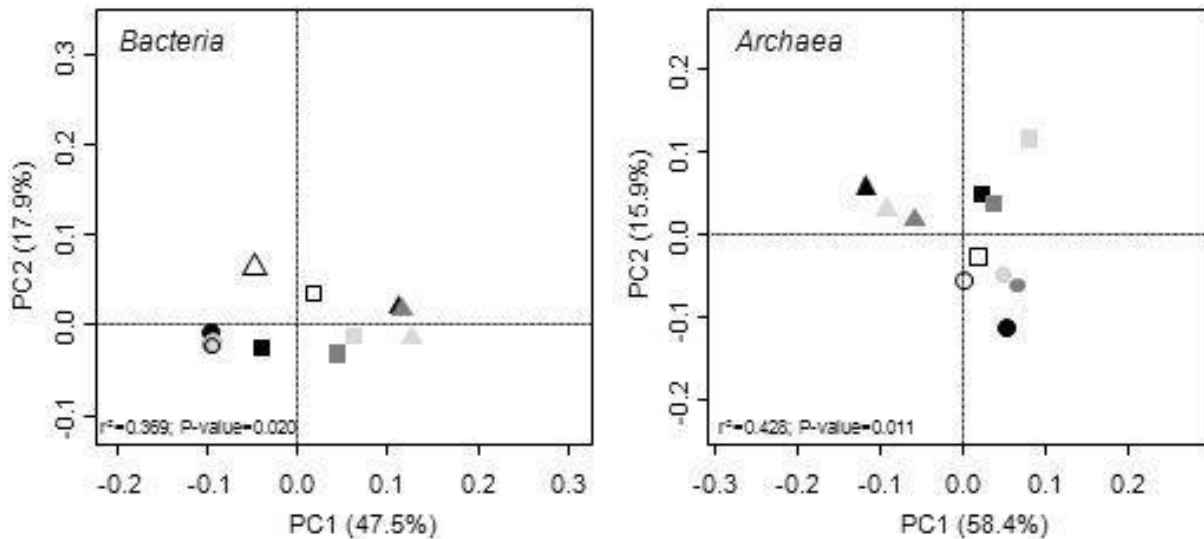


Figure IV-12: Influence of the inoculum and time on the difference in genetic structure of bacterial (on the left) and archaeal (on the right) communities through a PCA

The percentage variation explained by each principal component and the principal component scores of the sample are plotted on their respective axes. The symbol represented the soil inoculum (▲), the sediment inoculum (■), the sludge inoculum (●), in white the initial time, in light grey the HRT3, in dark grey the HRT4 and in black HRT5.

The global functioning of reactors was shown to be different according to the inoculum source (Figure IV-13). Significant correlations between some parameters of reactors functioning (Figure IV-13A) or CE-SSCP peaks (Figure IV-13B) and community structures ($P < 0.02$) are represented as arrows. The length and orientation of arrows indicated the proportional importance and direction of correlated factors.

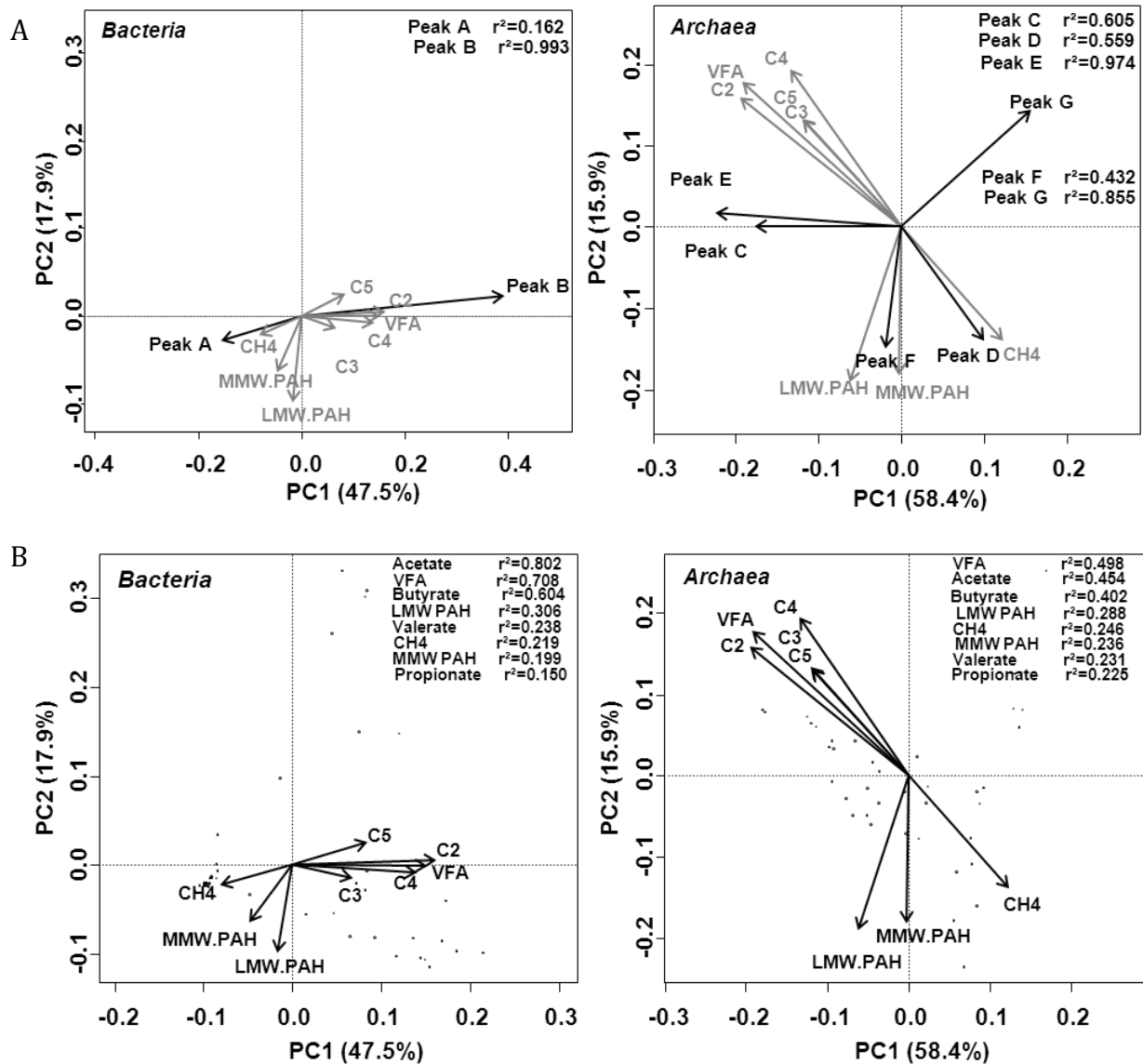


Figure IV-13: Principal Component Analysis (PCA) biplot of bacterial (on the left) and archaeal (on the right) communities

PCA displayed 65.4% of variance for bacterial CE-SSCP fingerprints and 74.3% of variance for archaeal CE-SSCP fingerprints. (A) Only significant correlations with operational characteristics were presented as arrows. (B) Most discriminant CE-SSCP peaks were highlighted as arrows that were directed according to their explanatory outputs.

The VFA concentration was the most highly correlated parameter of reactors functioning with changes in the genetic structure of *Bacteria* ($r^2=0.708$) and *Archaea* ($r^2=0.498$). The arrows indicating VFA accumulations were directed toward mostly CE-

SSCP fingerprints from soil and sediment samples. By contrast, the arrows for CH₄ production were directed toward CE-SSCP fingerprints from sludge samples. Changes in CE-SSCP fingerprints in relation with LMW-PAH and MMW-PAH removals were consistent for bacterial and archaeal community structures, but these variations were independent to the other parameters of reactor functioning, like VFA or CH₄.

The comparison between Figure IV-13A and Figure IV-13B allows studying which dominant populations varied in relation with functioning of the reactors. The bacterial populations identified as *peak B* was highly correlated with the changes in bacterial genetic structure ($r^2=0.99$). *The peak B* was more abundant in soil and sediment samples and co-varied with VFA. By contrast, the population identified as *peak A* was more abundant in sludge samples and co-varied with CH₄. For the *Archaea*, all peaks were highly correlated with the change of archaeal genetic structure. The *peak D* co-varied with the CH₄ proportion and the *peak F* with the LMW and MMW-PAH removal. The *peak E* and *C* co-varied in the same direction of the genetic structure of the reactor from soil while the *peak G* in the same direction of the genetic structure of the reactor from sediment.

IV.2.4. Discussion

The concentration of micropollutants had no effect on the bacterial communities. A slight effect was observed for the archaeal communities from soil and sludge inocula, with a higher CH₄ production than the control without pollutant. A decrease of the number of *Archaea* must induce a decrease of CH₄ production. Quantification of *Archaea* by Q-PCR on the 16S rDNA does not take into account their activity. Thus, either methanogenic *Archaea* are more active in the sludge and soil microcosms, or there is other effective methanogens in these microcosms. An overestimation of the viable *Archaea* in the soil and sludge microcosms can be also possible.

During the three first retention times, the inoculated microbial communities adapt to the feeding sludge and the operating conditions. The relative abundance of the population changes, the density of the community grows or is maintained, and the functioning parameters vary. After 4 HRT, the removal of DM and VS and the production and composition of the biogas were stable for all reactors. Similarly the pollutant removal efficiency and the structure and density of the microbial communities were constant in each reactor. As expected, a functional steady state is achieved after 4 HRT (Barret et al. 2010b).

The PCB anaerobic degradation is initiated by reductive dechlorination (Smidt et al., 2004). Some slightly substituted PCB can result of the degradation by dechlorination of highly substituted PCB following two reaction cascades (PCB180 → PCB153 → PCB 101 → PCB 52 and PCB 180 → PCB 138 → PCB 118 → PCB 28). For these reasons, it was

difficult to analyse the degradation of the lower substituted PCB, and we decided to present only the PCB180 removal. The limited number of PCB concentration measurement (one by reactor at initial and final times) causes some biases in the statistical analysis of the resulting data. No influence of the inoculum origin was evidenced on the PCB180 removal. The slight correlation between bacterial structure and PCB 180 removal must be interpreted with caution.

At steady state, the levels of PAH removal were around 30% for LMW-PAH, 20% for the MMW-PAH and 10% for HMW-PAH. Trably et al. (2003) found similar results with reactors inoculated with non-adapted sludge to PAH. These values were in the lower range of measure of PAH removal recorded on mesophilic anaerobic reactors (Barret et al. 2010a), on reactors fed with adapted to PAH sludge (Trably et al. 2003) or on measurements obtained in batch (Christensen et al., 2004). In the literature cited, the feeding with sludge served also as a source of active biomass. The actual performance thus represented the combination of the performance of microorganisms from feeding and from the inoculum itself. In our study, the concentration of active biomass derived only from the growth, the adaptation and the maintenance of the biomass inoculated.

Similarly, DM removal levels at steady state were low compared to the degradation potential previously reported for mesophilic methanogenic sludge (Barret et al. 2010a). These low yields of dry matter could result of a low activity of the microorganisms in the microcosms. Moreover, the diversity indexes were low in all three microcosms compared with values found in the literature for comparable ecosystems (Saikaly et al., 2005). This low diversity may affect the performance of general functions such as DM degradation. The DM and PAH removal efficiencies were similar and correlation was already found between these two parameters (Barret et al. 2010a; Trably et al. 2003). Our study confirms that higher molecular weight of the molecule gives higher correlation between the removal of dry matter and removal of PAH. This result strengthens the idea that the properties of molecules play an important role in their removal during anaerobic digestion.

The statistical analysis of bacterial and archaeal genetic structure suggested that the genetic differences due to the inoculum origin were maintained and amplified over the time. The experimental setup therefore allowed keeping three various microbial communities but expressing similar dry matter and PAH removal efficiency but different metabolic pathways.

Through the operating parameters of the reactors, we could distinguish between three different behaviors: fermentative, methanogenic and intermediate (Tableau IV-4). As expected, VFA concentration and CH₄ proportion were anti-correlated (Figure IV-13.) The reactors seeded with the soil inoculum had a fermentative functioning with low methane production. They were characterized by an accumulation of VFA, especially

acetate, a low pH below 6, a low methane production (less than 100 mL.g_{COD}⁻¹) and a dominant bacterial population (*peak B*). The reactors seeded with the sludge inoculum had a methanogenic functioning. They are characterized by low VFA concentrations, an alkaline pH, high methane productions (higher than 250 mL.g_{COD}⁻¹) and a dominant bacterial population (*peak A*). The reactors seeded with the sediment inoculum had a heterogeneous functioning, one assay had the characteristics of a fermentative reactor, another assay behaved like a methanogenic reactor and the one other assay had an intermediate functioning.

The reactors were all fed with the same sludge. The different metabolic performances could only be attributed to differences in structure and relative abundance of microbial communities. The correlations between the bacterial populations represented by the *peak A* and the CH₄ composition, and between the bacterial population represented by *peak B* and the VFA concentration suggested that the two bacterial populations were mostly involved in and that they were characteristic of the two respective metabolic pathways, methanogenic and fermentative. Similarly, the archaeal community represented by the *peak D* must be implied in the methanogenic performance of the reactor. The PAH removal did not depend on the genetic structure of the dominant bacterial community. In addition, the independence of the archaeal population represented by the *peak C, E* and *G* of the studied functioning parameters suggested that the abundance of these three populations were characteristic of either the origin of the inoculum or another parameter not studied here. Only the abundance of the archaeal population represented by the *peak F* suggested to be connected with the PAH removal.

Regardless the quantities and the composition of biogas produced, all reactors have the same PAH removal efficiencies. No correlation between functioning parameter (like VFA concentration or CH₄) and removal of pollutants was found. Many studies suggest a strong relationship between methanogenic activity and PAH removal (Trably et al. 2003; Chang et al. 2006; Bertin et al. 2007). Particularly, an inhibition of the PAH removal in presence of the inhibitor of the archaeal activity was reported (Chang et al. 2006). The anaerobic digestion results from a cascade reaction which has methanogenesis is the final step. Contrary to the literature, in our study, the micropollutants removals did not depend on the global functioning either fermentative or methanogenic during anaerobic digestion but were correlated to the dry matter (DM) removal. This suggests that the link between pollutant removal and anaerobic digestion is maybe to look at earlier stages in the production of methane.

IV.2.5. Conclusion

The study the influence of various complex anaerobic microbial communities on organic micropollutant removals, under the same organo-mineral condition, is a challenging topic. The original experimental strategy used in this study, based on

microbial communities extraction re-introduced in a single sterilized and characterized feeding sludge can meet this research goal.

The study of anaerobic reactors has preserved and even increased the genetic differentiation of microbial communities based on the origin of the inoculum.

The study of the PAH and PCB removal, production of biogas and other functioning parameters on the one hand and characterization of microbial communities on the other hand, allowed us to demonstrate the independence of changes in genetic structure with the removal of pollutants. Moreover, changes in bacterial populations were strongly related to metabolic pathways. The important link between the DM and pollutant removal was also confirmed. The independence between the metabolic pathway used for the degradation of the matter and the production of biogas with the pollutant removal was found. In contrast, the link between the molecule condensation and its removal rate was confirmed.

IV.3. Pour aller plus loin

IV.3.1. Discussions sur le devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les résultats de l'article précédent soulèvent une indépendance entre la production de méthane et les abattements en HAP. En effet, pour tous les inocul étudiés, à l'état d'équilibre, les HAP présentent les mêmes pourcentages d'abattement. Les abattements en HAP ne sont donc pas liés à la méthanogenèse. Delgadillo-Mirquez et al. (2011) suggèrent que les phénomènes de co-métabolisme peuvent jouer un rôle important dans le devenir des micropolluants hydrophobes lors de la digestion anaérobie. Le co-métabolisme est un processus qui permet aux microorganismes d'attaquer le micropolluant organique sans que les produits oxydés de cette dégradation ne soit assimilés par ce même microorganisme. Par ailleurs, des études expérimentales menées en réacteurs continus (Delgadillo-Mirquez, 2011) et en batch (Cea-Barcia, 2012) confirment que les abattements en HAP seraient plus liés à des phénomènes de co-métabolismes durant les étapes précédant la méthanogenèse. En régime continu, l'inhibition des étapes de la méthanogenèse par une concentration accrue en acide acétique n'entraîne pas d'effet sur les abattements en HAP (Delgadillo-Mirquez, 2011). En réacteur batch, Glenda Cea-Barcia a montré, pendant sa thèse, un lien entre production d'acétate et abattement des HAP. Elle a relevé une vitesse de dégradation du Dibenzoanthracène maximale quand la production/accumulation d'acétate était maximale et que la production de méthane était faible. Ces résultats suggèrent que l'étape de méthanogenèse n'influence pas la dégradation des HAP, par contre les étapes

d'hydrolyse la précédant semblent fortement liées aux performances d'abattement de ces molécules.

Dans nos systèmes, les communautés microbiennes ont développé différents comportements métaboliques (fermentaire et méthanogène). Cependant les premières étapes de dégradation de la matière (hydrolyses, acidogénèse et acetogénèse) sont communes aux deux comportements métaboliques. Seules les dernières étapes changent, d'un écosystème à l'autre, avec la réalisation ou non d'une méthanogénèse efficace. Ainsi, dans ces systèmes, l'indépendance entre la structure des communautés microbiennes et les abattements mesurés en HAP, couplée au fait que les mêmes abattements sont mesurés à l'état d'équilibre quel que soit l'inoculum étudié, suggèrent que le devenir des HAP n'est pas directement relié à l'activité d'une communauté spécifique et renforcent l'hypothèse de phénomène de co-métabolisme. L'indépendance du devenir des HAP par rapport aux productions de méthane enregistrées renforce donc l'idée que ces phénomènes de co-métabolisme sont liés aux premières étapes de la digestion anaérobie et non à la méthanogénèse.

IV.3.2. Compléments sur l'étude du devenir des polychlorobiphényles

Dans l'article présenté ci-dessus, seules les concentrations en PCB 180 sont discutées. En effet, il est souvent difficile d'interpréter les résultats d'abattement en PCB car une des premières étapes de la dégradation des PCB est leur déchloration. Il en résulte que les PCB les plus chlorés peuvent être déchlorés au fur et à mesure suivant les schémas : (PCB180 → PCB153 → PCB 101 → PCB 52 et PCB 180 → PCB 138 → PCB 118 → PCB 28). On peut alors observer une accumulation des molécules les moins chlorées, les PCB 52 ou 28, si par exemple les rendements de formation sont supérieurs aux rendements de dégradation de ces molécules. Les abattements ainsi mesurés pour chaque molécule résultent de la différence entre formation via les molécules plus fortement chlorées et dégradation en molécules moins chlorées ou en biphényles. Ces abattements ont été calculés pour chaque réacteur (Tableau IV-5). Les concentrations ont été mesurées au laboratoire INRA d'Arras. Seuls les échantillons correspondant au TSH 4,5 ont été analysés. A ce TSH, l'état d'équilibre est atteint. L'absence de réplicat des mesures rend l'interprétation des résultats peu aisée.

Pour chaque inoculum, deux réacteurs sur trois révèlent des abattements positifs (dégradation supérieure à formation) pour chacun des PCB mais un réacteur révèle à chaque fois des abattements négatifs (formation supérieure à dégradation). En l'absence de répétitions des mesures, exclure les échantillons ayant des abattements négatifs peut s'avérer risqué.

Tableau IV-5: Abattements en PCB à l'équilibre dans les différents réacteurs

Réacteurs	PCB 28	PCB 52	PDB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180	PCB total
Inoculum sol 1	21	15	9	5	4	3	2	7
Inoculum sol 2	16	14	9	6	4	6	5	8
Inoculum sol 3	11	10	-1	-1	-6	-5	-5	-1
Inoculum sédiment 1	39	14	27	23	22	20	18	23
Inoculum sédiment 2	2	-6	-10	-8	-11	-13	-13	-9
Inoculum sédiment 3	29	28	20	21	16	16	15	20
Inoculum boue 1	27	26	16	12	10	10	5	14
Inoculum boue 2	-9	-10	-8	-13	-15	-16	-17	-13
Inoculum boue 3	29	32	24	17	16	14	9	19

Au vu de ces résultats, plusieurs observations peuvent toutefois être faites. Pour les PCB les moins chlorés (PCB 28 et 52), il semblerait que l'origine de l'inoculum n'ait pas d'influence sur les capacités de dégradation du système. L'écosystème sol pour lequel les abattements des PCB les plus chlorés sont très faibles, n'induisant donc que très faiblement la production de PCB légers, est donc capable de dégrader des PCB faiblement chlorés. A l'inverse, les abattements des PCB 28 et 52 sont légèrement plus élevés pour l'écosystème sédiment, avec des abattements élevés mesurés aussi sur les PCB lourds, induisant donc potentiellement la formation de PCB légers. Il semblerait donc que pour cet écosystème provenant d'un sédiment adapté à une contamination aux PCB, la communauté microbienne présente une activité de déchloration plus importante déployée pour l'ensemble des molécules PCB du plus léger au plus lourd. Pour les PCB de 5 à 6 chlores, l'inoculum sol possède les moins bons abattements. Enfin pour le PCB 180, les meilleurs abattements sont obtenus avec l'inoculum provenant de sédiments contaminés. De plus, de manière générale, on peut observer une diminution des abattements en PCB avec l'augmentation du degré de chloration des molécules (Figure IV-14). Ces résultats sont en opposition avec d'autres études qui montrent qu'en condition anaérobie mésophile, les PCB les plus chlorés sont ceux pour lesquels de meilleurs abattements sont observés (Benabdallah El-Hadj et al. 2007; Barret et al. 2010a). Par analogie, on peut supposer que dans notre système, les rendements de dégradation des PCB les moins chlorés sont suffisamment supérieurs à ceux des PCB les plus chlorés pour observer une dégradation des PCB 28 et 52 malgré leur formation due à la déchloration des autres congénères.

Si l'on observe l'abattement moyen sur l'ensemble des PCB suivant l'inoculum, l'inoculum provenant des sédiments enregistre les meilleurs abattements. Or, cet inoculum provient d'un sédiment contaminé en PCB, on peut émettre l'hypothèse que les populations provenant de ces sédiments possèdent une activité spécifique vis-à-vis de ces micropolluants qui est plus forte que dans le cas des deux autres inocula.

Pour confirmer ces observations et permettre une étude statistique fiable des données, il aurait été préférable de mesurer les concentrations en PCB pour les trois demi-TSH formant l'état d'équilibre (TSH 4/4,5/5). Cela nous aurait entre autre permis d'exclure ou non les résultats obtenus à TSH 4,5 pour les réacteurs sol-3, sédiment-2 et boue-2.

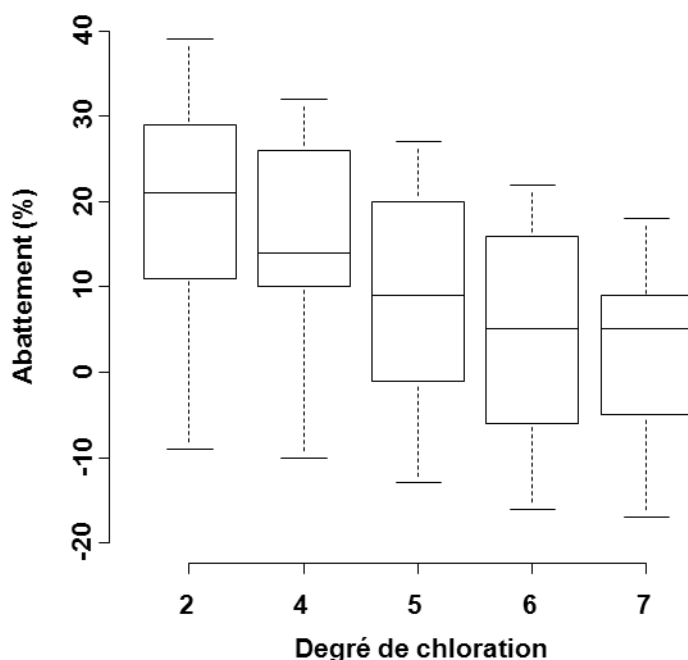


Figure IV-14: Dégradation moyenne des PCB sur l'ensemble des réacteurs, en fonction de leur degré de chloration

IV.3.3. Etude du devenir des nonylphénols

Comme pour les HAP, la dégradation des nonylphénols a été suivie au cours du temps (Figure IV-15).

Contrairement aux HAP, dès le début du régime continu, les NP ont le même comportement quel que soit l'inoculum étudié. Au bout de 80 jours, au TSH 4, on calcule des abattements négatifs en NP, ce qui pourrait suggérer un phénomène d'accumulation ou de production de ces molécules, à partir des dérivés nonylphénol polyéthoxylés (NPEO). Cependant la ponctualité de ce phénomène, le fait qu'il se produise dans tous les réacteurs et la valeur particulièrement basse de NP mesurée dans la boue d'alimentation laisse supposer une erreur de mesure pour ce point et une sous-estimation de la concentration en NP dans l'alimentation (Figure IV-16).

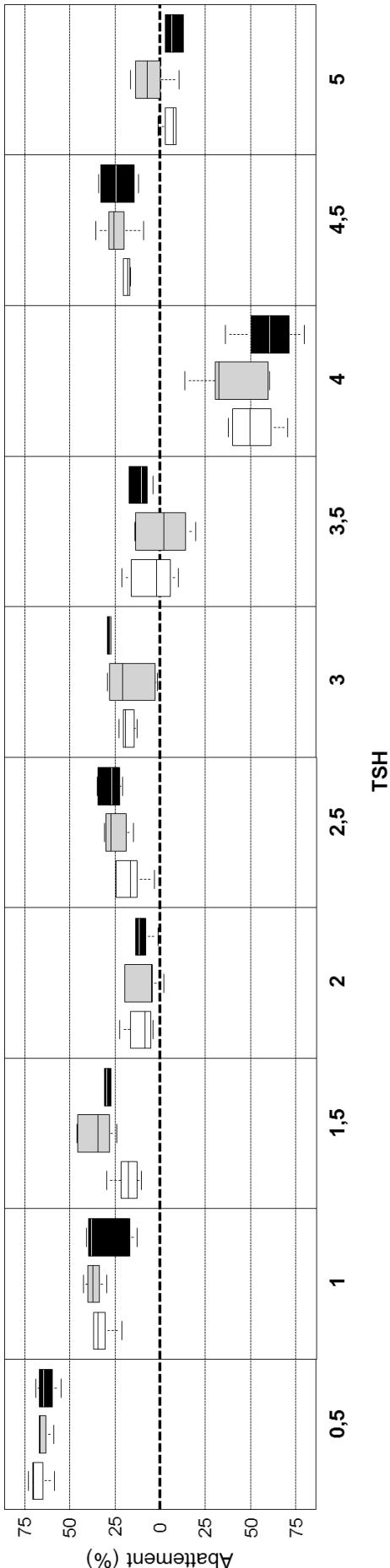


Figure IV-15: Dynamique des abatements en NP au cours du temps (indiqué en Temps de Séjour Hydraulique)
 En blanc Dsed, en gris DBoue et en noir DBoue

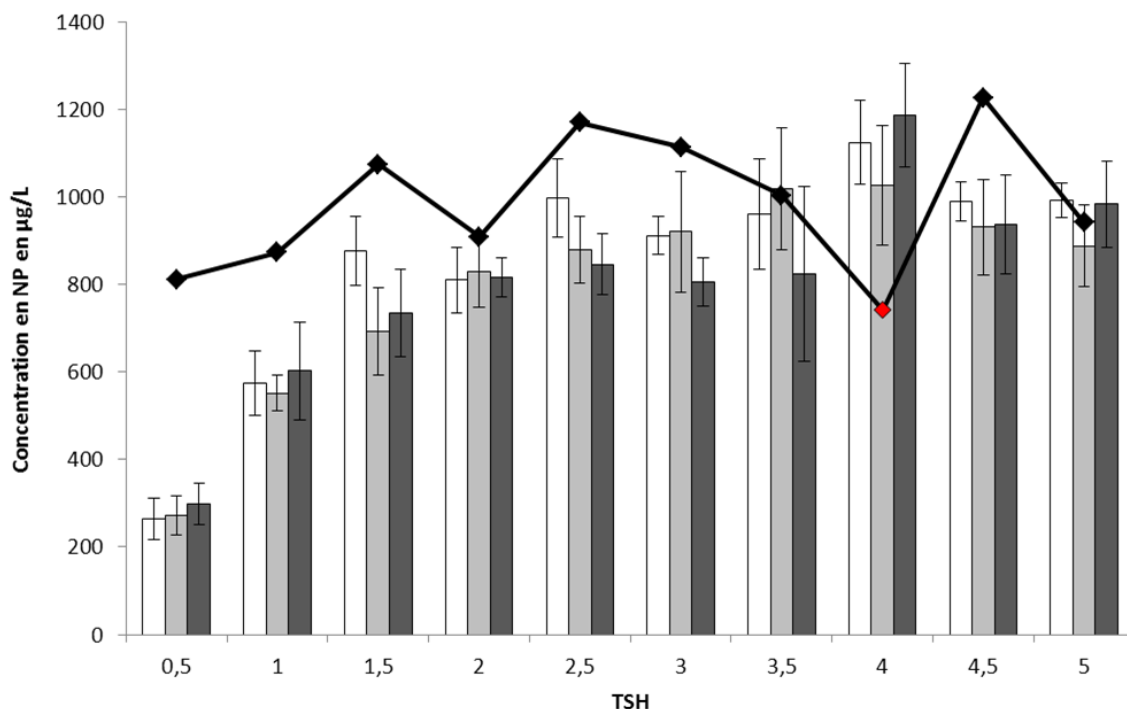


Figure IV-16: Dynamique, au cours du temps, des concentrations en NP mesurée en µg/L de boue

□ Inoculum sol ▒ Inoculum sédiment ■ inoculum boue ◆ Boue d'alimentation

Si on exclut les valeurs obtenues au quatrième temps de séjour, pour les derniers temps de séjour (4,5 et 5), on constate un abattement très faible, voire nul de ces molécules. Les NP ne sont pas (voir que très faiblement) abattus dans nos systèmes ou sont produits autant qu'il sont consommés. Chang et al. (2005) montrent que la dégradation du NP en condition méthanogène est l'une des moins favorable des conditions anaérobie, et Hernandez-Raquet et al. (2007) n'observent pas de dégradation de cette molécule. Il n'est donc pas surprenant d'enregistrer des abattements en NP faibles dans nos systèmes. La digestion anaérobie peut entraîner la dégradation de NPEO qui produisent ainsi du NP (Patureau et al. 2008a; Paterakis et al. 2012). Il existe donc au sein des systèmes de digestion anaérobie, un équilibre entre les phénomènes de production du NP (via la dégradation des NPEO) et la dégradation du NP. Suivant l'efficacité de l'un ou de l'autre, des abattements en NP peuvent être mesurés ou non. L'absence d'abattement de NP tel que nous le mesurons ou sa ponctuelle accumulation peut être due au fait que la dégradation de NPEO est aussi importante ou ponctuellement plus importante que la dégradation du NP. Dans nos expériences les NPEO n'ont pas été dosés mais des pics pouvant correspondre à ces molécules ont été identifiés sur nos spectres d'analyse HPLC aussi bien dans l'alimentation que dans les sorties de réacteur. Etablir un bilan, sur l'ensemble des molécules (NP+NPEO), nous permettrait de mieux appréhender les phénomènes de production/dégradation au sein de nos systèmes.

Observons cependant que tout comme pour les HAP, le comportement des NP (tel que nous le mesurons dans nos systèmes), est similaire quelle que soit la voie métabolique empruntée. Les populations méthanogènes ne semblent pas particulièrement impliquées dans la dégradation de ces molécules.

Chapitre V. RELATION ENTRE ABONDANCE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES ET FONCTIONNEMENT DES MICROCOSMES

Dans ce chapitre, grâce à l'analyse de données de pyroséquençage nous apporterons des précisions sur l'étude des relations entre l'abondance des communautés microbiennes et les fonctions générales exprimées par nos trois écosystèmes. Puis, nous nous intéresserons aux fonctions de dégradation des micropolluants. Pour ce faire, deux types d'approche seront utilisés : le suivi du fractionnement isotopique d'un micropolluant marqué au carbone 13 et la recherche de la présence de gènes fonctionnels.

V.1. Communautés microbiennes et activités majoritaires au sein des microcosmes

Dans le chapitre précédent, nous avons caractérisé, par des paramètres de fonctionnement, mais aussi par des paramètres microbiologiques (structure des communautés obtenues par empreinte moléculaire, abondance mesurée par PCR quantitative), deux groupes de fonctionnements différents, caractérisés par des activités majoritaires différentes (acidogénèse, méthanogénèse), l'une fermentaire associée aux **réacteurs inoculés à partir des microorganismes de sol (DSol)** et l'autre méthanogène associée aux **réacteurs inoculés à partir de microorganismes de boue (DBoue)**. Les **réacteurs inoculés à partir de sédiment (DSed)** se sont répartis dans les deux groupes.

Les empreintes moléculaires nous ont permis d'appréhender la dynamique des communautés microbiennes. Dans le but de mieux décrire à l'état d'équilibre, la divergence des communautés microbiennes entre conditions mais aussi la variabilité entre répliquats de réacteurs au sein d'une même condition, des inventaires moléculaires du gène d'ADN ribosomique 16S ont été réalisés sur des échantillons d'extrait d'ADN de chaque réacteur au TSH 5 (état d'équilibre). Le pyroséquençage peut en outre nous donner des indications sur la présence de taxons pouvant, selon la littérature, être impliqués dans la dégradation des micropolluants organiques.

V.1.1. Etude de la diversité des communautés

Le nombre de séquences détectées par échantillon varie de 3364 à 15538 séquences suivant l'échantillon étudié. Comme le nombre de séquences obtenues par échantillon est très hétérogène (Tableau V-1), les analyses de diversité ont été réalisées sur un sous-échantillon de séquences de même taille.

En effet, le calcul des indices de diversité de Simpson, Shannon et richesse peut être influencé par la taille de l'échantillonnage (Gihring et al., 2012). Nous avons ramené la taille de chaque échantillon à la valeur du nombre de séquences de l'échantillon le plus petit (ici 3364).

Tableau V-1: Données de diversité obtenues par pyroséquençage du gène d'ADNr 16S sur les 9 réacteurs inoculés avec les 3 inocula à l'état d'équilibre (TSH 5).

Nb : nombre, Nb seq: nombre de séquences

Réacteurs	Nb Séquences	Nb OTU	Nb seq bactéries	Nb seq archées	Nb Phyla	Nb Genre	Nb Espèces
DSol1	4409	116	4392	16	8	28	41
DSol2	4717	133	4608	27	7	27	42
DSol3	3364	154	3295	10	7	25	39
DSed1	6303	149	6140	35	6	28	43
DSed2	14052	260	13627	58	7	38	58
DSed3	15538	367	14035	192	12	50	76
DBoue1	11902	475	10199	240	15	60	103
DBoue2	14168	510	12831	151	19	66	107
DBoue3	11839	469	10413	238	17	59	100

Sur la base des séquences uniques, notées unités taxonomiques opérationnelles (OTU), nous avons calculé les indices de diversité de Simpson, Shannon et richesse que nous avons comparé avec ceux calculés grâce aux données de CE-SSCP (Tableau V-2). La comparaison de l'indice de Simpson démontre qu'il n'y a pas de différences significatives (T-test, p-value > 0.05) pour chaque type d'inoculum entre les valeurs trouvées par pyroséquençage et celles trouvées par CE-SSCP ; par contre une sous-estimation systématique des valeurs de l'indice de Shannon a été observées en utilisant les données fournies par empreinte moléculaire, avec cependant une forte corrélation (cor = 0.893, p-value = 0.001) entre ces valeurs et celles obtenues par pyroséquençage. Ce constat n'est pas surprenant car la CE-SSCP n'est pas une méthode robuste pour le calcul de l'indice de Shannon. En revanche, étant donné le nombre important de séquences obtenues par pyroséquençage, les valeurs obtenues pour cet indice de Shannon sont plus réalistes (Haegeman et al. communication personnelle). Les données de CE-SSCP ont tendance à sous-estimer la valeur de l'indice de Shannon de nos échantillons mais il est intéressant de constater que les tendances sont respectées.

La comparaison de la diversité microbienne des échantillons a été réalisée avec les trois indices de diversité, prenant différemment en compte l'abondance relative des espèces et accordant plus ou moins de poids aux espèces minoritaires. Quelle que soit la mesure employée, une variation en fonction du type d'inoculum est observée, avec toujours une plus forte diversité mesurée dans les échantillons DBoue.

Tableau V-2: Comparaison des indices de diversité de Simpson (*D*), Shannon (*H*) et richesse (*R*) obtenus par empreinte moléculaire en CE-SSCP et par pyroséquençage.

(SSCP): indice calculé par CE-SSCP, (Pyro): indice calculé par pyroséquençage, Nb : nombre

Réacteurs	<i>R</i> (Pyro)	Indice de diversité			
		<i>D</i> (SSCP)	<i>D</i> (Pyro)	<i>H</i> (SSCP)	<i>H</i> (Pyro)
DSol1	36	1,55	2,06	0,78	2,74
DSol2	106	2,34	2,49	0,99	3,33
DSol3	37	2,40	2,34	1,03	2,99
DSed1	91	2,41	2,26	1,00	3,09
DSed2	153	2,56	1,78	1,18	3,07
DSed3	185	2,79	2,08	1,38	3,37
DBoue1	259	3,02	3,59	1,45	4,38
DBoue2	241	3,41	3,08	1,42	4,07
DBoue3	247	3,26	3,33	1,54	4,19

V.1.2. Comparaison de la quantification des microorganismes par pyroséquençage et par Q-PCR

D'après les données de pyroséquençage, le domaine des bactéries représente la grande majorité des séquences détectées. En effet, les bactéries représentent 99.5 % (± 0.2), 98.9 % (± 0.5) et 97.6 % (± 0.8), respectivement pour les groupes de réacteurs DSol, DSed et DBoue. Ces données confirment bien celles obtenues précédemment par Q-PCR (§ IV.2.3.2), quel que soit l'inoculum (T-test, $p > 0.05$). Les proportions de bactéries et d'archées varient en fonction de l'origine de l'inoculum des réacteurs (ANOVA, $p = 0.02$). Plus précisément, encore une fois, les groupes DBoue et DSol se discriminent alors que le groupe DSed est proche de DSol. A partir de ces données, il est possible de calculer un ratio Archées/Bactéries ($R_{A/B}$) en utilisant la formule suivante :

$$R_{A/B} = 100 * \exp[(\log_{10}(\text{Nb archées}) - \log_{10}(\text{Nb bactéries}))] \text{ (en \%)}$$

Avec

Nb archées : le nombre de séquences d'archées

Nb bactéries : le nombre de séquences de bactéries

En toute logique, une forte corrélation a été retrouvée entre la production de méthane et ce ratio Archées/Bactéries ($\text{cor} = 0.933$, $p\text{-value} < 0.001$) (Figure V-1).

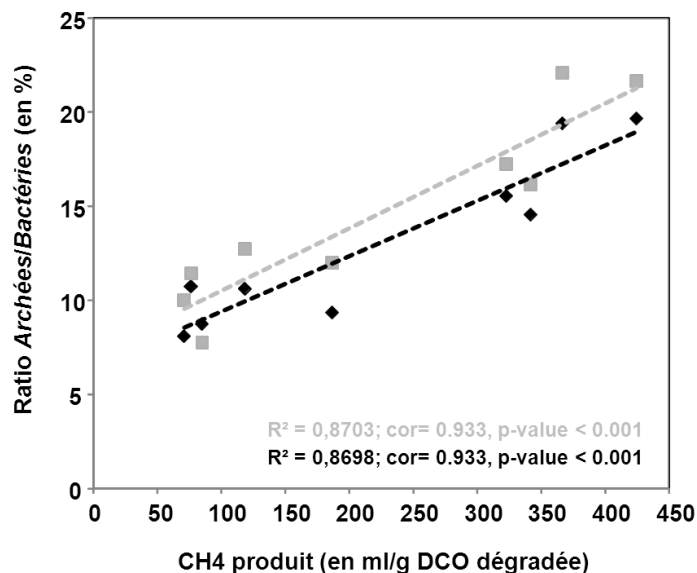


Figure V-1: Représentation du ratio Archées/Bactéries en fonction de la production de méthane à l'état d'équilibre

Ratios calculés avec données de Q-PCR (■) et de pyroséquençage (◆).

V.1.3. Recherches des espèces discriminant les échantillons

Des analyses en composante principale (ACP) ont été réalisées, à partir des données de pyroséquençage, en utilisant les proportions de chaque espèce, pour discriminer nos échantillons. Il s'avère que cette représentation est très proche de celle obtenue en réalisant une ACP à partir des données de CE-SSCP (Figure V-2).

La très grande robustesse des comparaisons entre échantillons, observée avec les deux techniques moléculaires (CE-SSCP et pyroséquençage) est encourageante. En effet, il se pose toujours cette question de biais imputables à chacune des techniques et de représentativité des résultats lorsqu'ils sont obtenus à partir de plusieurs méthodes moléculaires différentes (Smalla et al 2007), en particulier si un même échantillon est analysé via deux méthodes qui ne ciblent pas la même région de l'ADN 16S (Bowen De León et al. 2012).

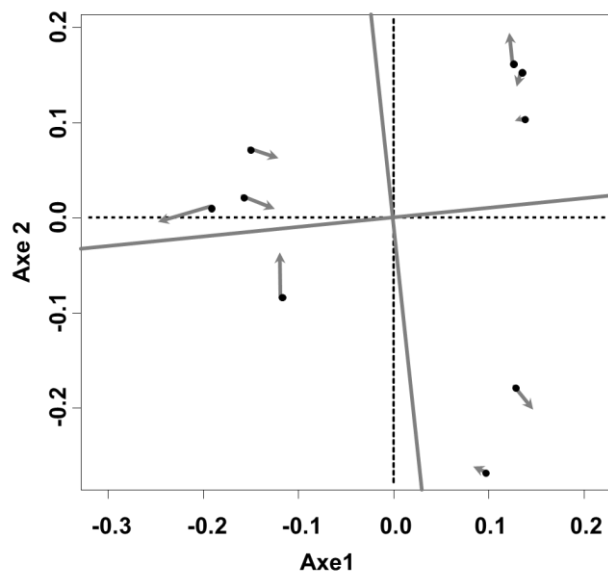


Figure V-2: Représentation comparée de la discrimination des échantillons par analyse en composantes principales des données de CE-SSCP (en noir) et pyroséquençage (en gris).

Les flèches grises représentent les changements de position, d'une projection à l'autre, des points représentant nos 9 échantillons.

L'ACP nous a permis de mettre en évidence 57 espèces (dont quatre archées parmi lesquelles trois sont absentes des échantillons DSol) dont les abondances permettent de discriminer statistiquement nos échantillons (12 espèces $p \leq 0.001$; 19 espèces $p \leq 0.01$; 26 espèces $p \leq 0.05$) (Figure V-3). Si l'on considère les 20 espèces les plus abondantes, 7 d'entre elles sont très hautement discriminantes, 7 sont hautement discriminantes et 2 sont discriminantes. Une ACP sur la base des 20 espèces les plus abondantes nous offre la même représentation des données. Qu'il s'agisse de l'ACP avec les données CE-SSCP ou de l'ACP obtenue par pyroséquençage, nos échantillons sont bien discriminés selon l'origine de l'inoculum (Figure V-3). L'ACP obtenue à partir des données CE-SSCP nous permet de mettre en évidence 4 pics qui permettent d'expliquer la discrimination des échantillons. L'ACP, obtenue à partir des données de pyroséquençage, nous permet de mettre en évidence des espèces, discriminant nos échantillons.

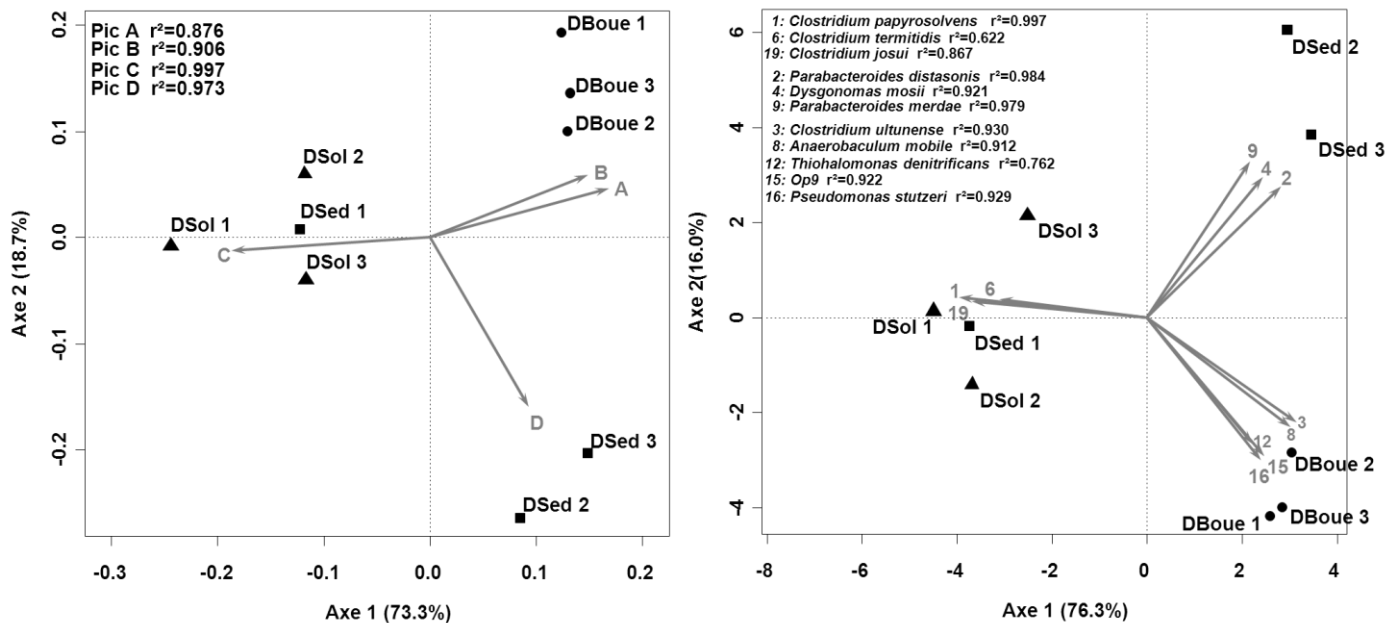


Figure V-3: Représentation des variables discriminantes sur les analyses en composante principale (ACP) obtenues à partir des données de CE-SSCP (à gauche) et des espèces par pyroséquençage (à droite).

L'ACP explique 92.0 % de la variance des empreintes moléculaire de bactéries (CE-SSCP) et 92,3 % de la variance des proportions d'espèces obtenues par pyroséquençage. Les réacteurs dont l'inoculum provient du sol, du sédiment, de la boue sont représentés, respectivement par les symboles suivant :▲, ■, ●. A gauche les flèches représentent les pics les plus discriminants et à droite les espèces les plus discriminantes parmi les 20 plus abondantes.

Les échantillons DSol sont caractérisés par la présence d'un pic majoritaire en CE-SSCP mais de trois espèces bactériennes proches de trois espèces bactériennes du genre *Clostridium*. Ces bactéries anaérobies sont capables de transformer par fermentation de nombreux monomères en éthanol, CO₂, H₂ et acétate (Madden et al., 1982; Sukhumavas et al., 1988; Hethener et al., 1992). Le fait que les échantillons DSol soient discriminés par des bactéries appartenant exclusivement au genre *Clostridium* est cohérent avec le fait que ce groupe de réacteurs est caractérisé par l'accumulation d'AGV (Figure V-4). L'abondance du genre *Clostridium* dans nos échantillons est par ailleurs assez bien corrélé avec les concentrations en AGV mesurées (cor = 0.851, p-value = 0.003). Les échantillons DSed 2 et 3 sont caractérisés par la présence de trois espèces bactériennes (deux du genre *Parabacteroides* et une du genre *Dysgonomonas*) appartenant toutes au phylum des *Bacteroides*. Enfin les échantillons de boues sont caractérisés par la présence de 5 espèces différentes (*Clostridium ultunense*, *Anaerobaculum mobile*, *Thiohalomonas denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* et *op9*), appartenant au phyla des *Firmicutes*, *Synergitetes*, *Proteobacteria* et *op9*. Les phyla *Bacteroides*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* sont des phyla fréquents dans les réacteurs en condition méthanogène (Nelson et al. 2011) et le phyla des *Synergitetes* apparait comme un phyla caractéristique des environnements anaérobies. (Godon et al. 2005).

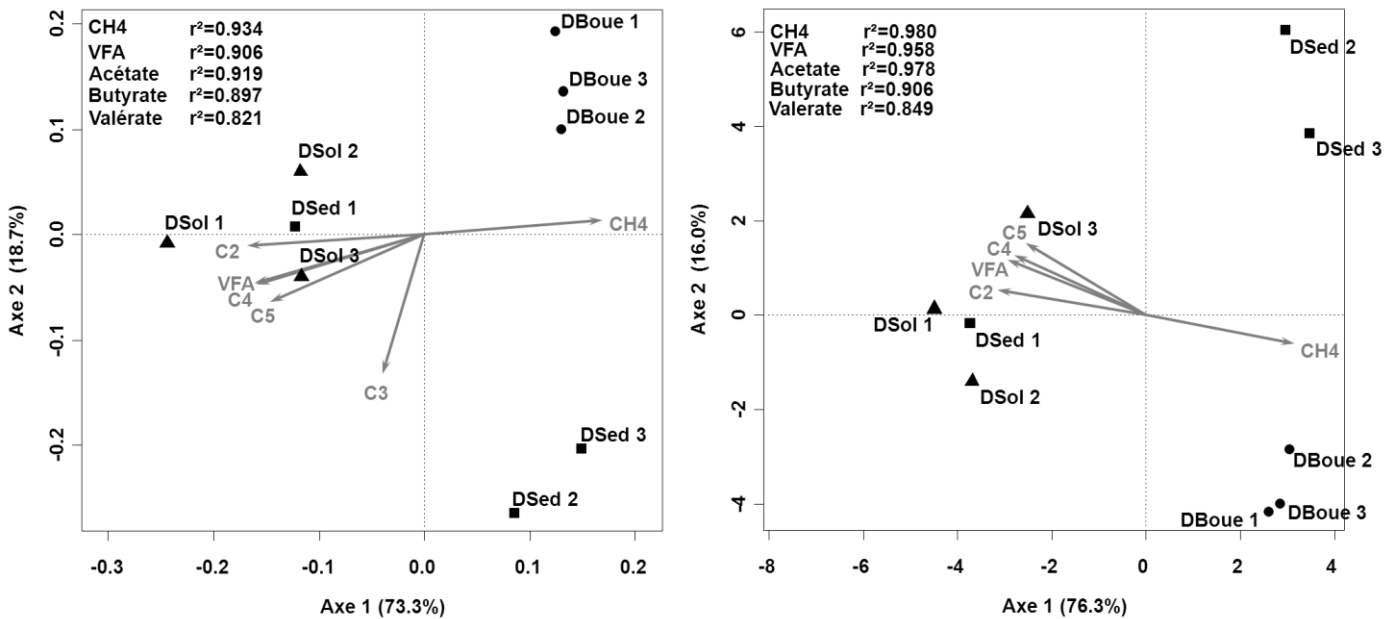


Figure V-4: Représentation des paramètres de fonctionnement discriminants sur les analyses en composantes principales (ACP) obtenues à partir des données de SSCP (à gauche) et des proportions des différentes espèces obtenues par pyroséquence (à droite).

L'ACP explique 92 % de la variance des empreintes moléculaire de bactéries (SSCP) et 92,3 % de la variance des proportions d'espèces obtenues par pyroséquence. Les réacteurs dont l'inoculum provient du sol, du sédiment, de la boue sont représentés, respectivement par les symboles suivant :▲, ■, ●. Les flèches représentent les paramètres de fonctionnement les plus discriminants.

Les échantillons de DBoue et DSed 3 se caractérisent aussi par la présence d'au moins 5 espèces d'archées différentes alors que seulement une ou deux espèces sont présentes dans les autres réacteurs (Figure V-5). Ces espèces appartiennent toutes au phylum des *Euryarchaeota* majoritairement présent dans les réacteurs en condition méthanogène (Nelson et al. 2011). La diversité des archées et les ratios Archées/Bactéries plus importants dans ces réacteurs, DBoue et DSed 3 concordent avec une production plus forte de méthane.

Aucuns des genres d'archées présents dans nos échantillons ne correspondent aux genres *Methanosaeta* et *Methanoculleus* que Berdugo-Clavijo et al. (2012) suggèrent comme pouvant jouer un rôle important dans le métabolisme de HAP léger (à deux noyaux aromatiques) en condition méthanogène.

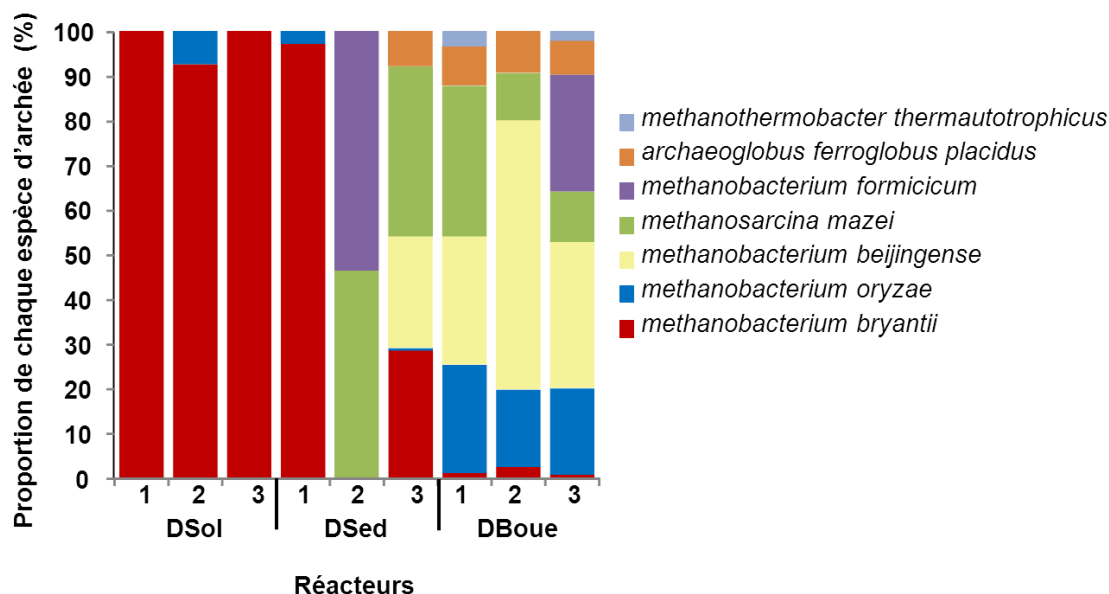


Figure V-5: Proportion de chaque espèce d'archées par rapport au nombre total d'archées présents dans les réacteurs

Les principaux phyla bactériens représentés dans nos réacteurs sont les *Firmicutes*, les *Bacteroides*, les *Synergistetes* et les *Proteobacteria* (Figure V-6). Par rapport aux travaux de (Nelson et al. 2011) et de (Werner et al., 2011), le phylum des *Chloroflexi* est sous-représenté dans nos systèmes. Absent des échantillons DSol et DSed, il n'est présent que dans les échantillons DBoue et représente moins de 1 % des séquences trouvées. En particulier, aucune séquence du genre *Dehalococcoides*, bactéries connues pour leur aptitude à dégrader les PCB en conditions anaérobies (Adrian et al. 2009; Fennell et al. 2004) n'a été retrouvée. Le phylum des *Firmicutes* est le plus présent dans nos systèmes. Pour les réacteurs DSol, il se compose essentiellement des bactéries du genre *Clostridium* alors que dans les réacteurs DBoue il se compose majoritairement de l'espèce *Clostridium ultunense*, capable d'oxyder l'acétate en association syntrophique avec des bactéries hydrogénotrophes méthanogènes (Schnurer et al., 1996) et des bactéries du genre *Syntrophomonas*, capables de dégrader les acides gras en présence entre autre de consortium bactérien méthanogène ou consommateur d'hydrogène (McInerney et al. 1981; Zhang et al. 2004; McInerney et al. 2008). Les proportions de bactéries appartenant au genre *Syntrophomonas* sont d'ailleurs anti-corrélées aux concentrations en acides gras volatils trouvés dans nos systèmes (cor = - 0.860, p-value = 0.003).

Bien que majoritairement présente dans les réacteurs DSol, la famille des *Clostridiceae* est présente dans l'ensemble de nos systèmes. Berdugo-Clavijo et al. (2012) suggèrent que cette famille peut jouer un rôle important dans la dégradation de HAP légers en condition méthanogène. Par ailleurs, la famille des *Desulfatobacteraceae*, impliquée selon Musat et al. (2009) dans la dégradation des HAP, en condition sulfato-

réductrice n'est retrouvée que dans les groupes DSol et DSed. L'espèce *Pseudomonas stutzeri* potentiellement impliquée dans les processus de dégradation des HAP (Rockne et al., 2000) et NP (De Weert et al., 2011) en condition dénitrifiante, est retrouvée dans nos trois groupes de réacteur DSol, DSed et DBoue et de manière plus abondante dans DBoue. Les variations d'abondances de ces familles et espèces ne peuvent expliquer à elles seules l'homogénéité des abattements en HAP et NP mesurés dans nos systèmes.

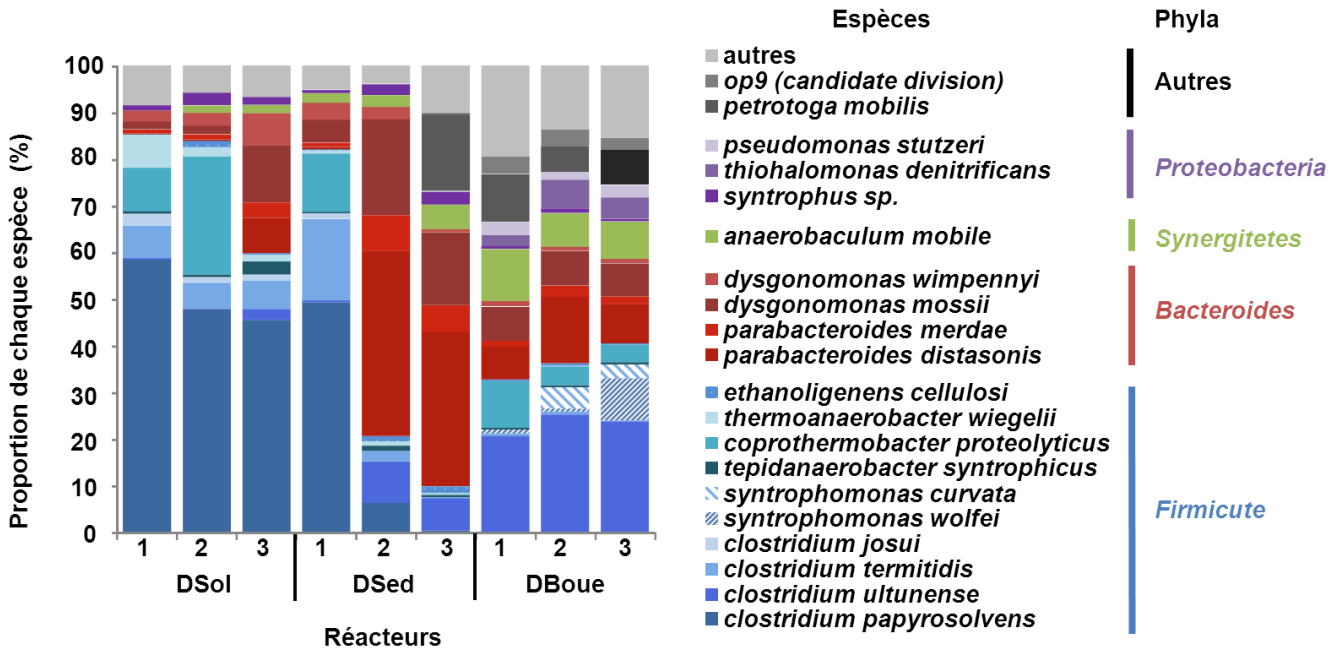


Figure V-6: Proportion dans chaque réacteur des 20 espèces les plus abondantes

En observant le profil des proportions des espèces bactériennes majoritaires dans chaque réacteur, encore une fois, il apparaît que les réplicats DSol et DBoue forment 2 groupes homogènes distincts. Par contre le groupe DSed est hétérogène avec DSed1 dont le profil est très proche de DSol, DSed 3 plus proche de DBoue et DSed2 un peu à part.

L'ensemble de ces résultats obtenus par pyroséquençage, confirme d'une part les résultats obtenus par empreintes moléculaire et Q-PCR et d'autre part confirme bien, à différents niveaux, une discrimination de nos populations microbiennes selon l'origine et les métabolismes mis en jeu au sein de nos systèmes.

V.2. Communautés microbiennes et fonctions minoritaires des microcosmes

Dans cette partie, nous avons développé une approche liée au potentiel microbiologique de dégradation des micropolluants organiques. Dans un premier temps, nous avons développé une méthodologie permettant de suivre les populations dégradant les HAP et plus spécifiquement le phénanthrène par marquage isotopique du

micropolluant utilisé comme substrat. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux populations impliquées dans la dégradation des molécules aromatiques et pour ce faire nous avons choisi comme indicateur fonctionnel le gène *bssA*, qui code pour une enzyme impliquée dans l'ouverture du cycle aromatique en condition anaérobie. Enfin, dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés aux acteurs de la déhalogénéation réductrice (voie possible de dégradation des PCB) et pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec comme marqueur fonctionnel le gène *rdh*. Selon la littérature, ce gène est présent chez tous les isolats bactériens capables de déchlorer les PCB en condition anaérobie.

V.2.1. Etude du potentiel de dégradation du phénanthrène par les microorganismes issus d'un réacteur de méthanisation

Dans le but de suivre la dégradation d'un micropolluant et d'identifier les populations microbiennes impliquées dans sa dégradation, des tests en microcosmes sont réalisés à partir de phénanthrène marqué en ^{13}C , utilisé comme substrat (§ II.6.2). Une fois dégradé, il est alors possible d'étudier les produits marqués de dégradation et de mettre en évidence la présence d'intermédiaires réactionnels. Couplée à des méthodes de microbiologie, l'étude du devenir d'un substrat marqué peut également permettre d'identifier les microorganismes actifs impliqués dans la dégradation de la molécule. L'assimilation du ou d'une partie du substrat marqué va entraîner l'enrichissement des constituants cellulaires des microorganismes responsables de sa dégradation.

La technique de « stable isotope probing » (SIP) permet par ultracentrifugation, de séparer les acides nucléiques de composition isotopique naturelle de ceux enrichis en ^{13}C après incorporation du substrat dans la biomasse. Il est alors possible de pré-identifier les microorganismes responsables de la dégradation de la molécule marquée utilisée comme substrat.

Pour pouvoir fournir suffisamment de boue pour les tests d'assimilation du phénanthrène ^{13}C , deux réacteurs de 400 ml effectuant efficacement la méthanisation ont été réunis dans un réacteur semi automatisé de 800 ml (§ II.6.1). Les réacteurs produisant le plus de méthane étant les réacteurs inoculés à partir des communautés issues de la boue (§ IV.2.3.1), ce sont deux d'entre eux qui ont été choisis. La boue de sortie de ce réacteur a ensuite été utilisée pour des tests en microcosmes anaérobies contenant du phénanthrène ^{13}C (§ II.6.2).

Des expérimentations en microcosmes ont été menées en partenariat avec l'IRSTEA d'Antony. Plusieurs microcosmes ont été réalisés :

- Deux fioles de 50 mL contenant du phénanthrène marqué au ^{13}C sur tous les atomes de carbone à des concentrations de 0,1, 1 et 3 mg/L ont été inoculées avec respectivement 5, 50 et 50 mg de MV. La composition isotopique du

biogaz produit a été analysée régulièrement par « Isotope-ratio mass spectrometry » (IRMS). Ce dispositif permet de mettre en évidence la dégradation du substrat en condition de croissance par enrichissement en ^{13}C du méthane produit.

- Une fiole contenant du phénanthrène marqué au ^{13}C aux mêmes concentrations, mais avec ajout d'un agent biocide (HgCl_2), permet de vérifier que la dégradation potentiellement observée est la résultante de phénomènes biotiques.
- Une fiole avec du phénanthrène non marqué aux mêmes concentrations sert de témoin négatif en vue de l'utilisation de la technique SIP.

Les résultats de suivi de la composition isotopique du biogaz au cours du temps sont présentés en Figure V-7. Aucune production de méthane n'a été enregistrée dans les témoins contenant le biocide.

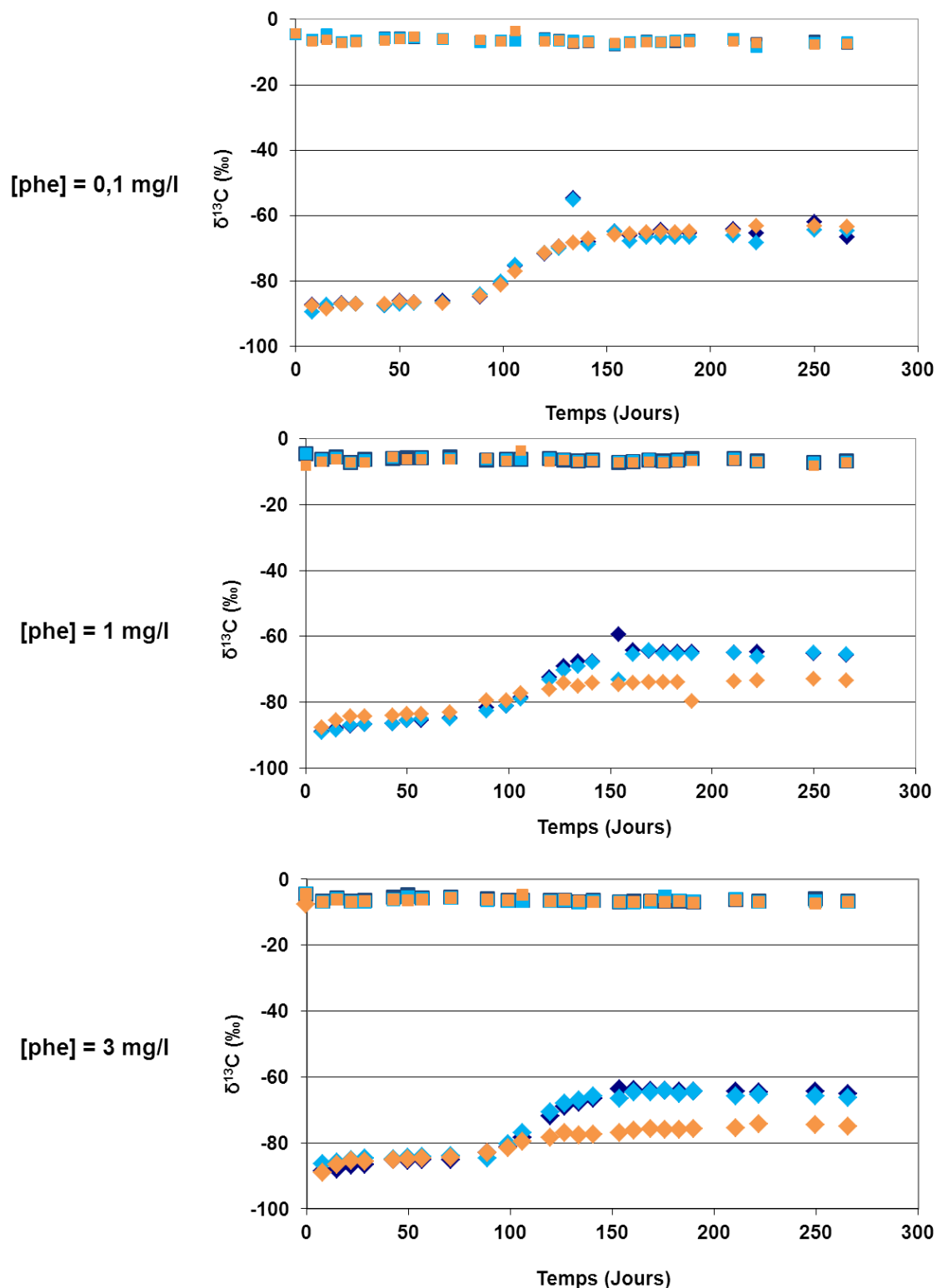


Figure V-7: Fractionnement isotopique ($\delta^{13}\text{C}$ en ‰) du biogaz produit au cours du temps par les microcosmes aux trois concentrations différentes de phénanthrène.

Les symboles ■ représentent le fractionnement du CO_2 , les ◆ celui du CH_4 . En bleu, sont présentés les résultats des duplicats des incubations avec le phénanthrène marqué au ^{13}C , en orange ceux obtenus avec le phénanthrène non marqué

Dans les microcosmes contenant une concentration en phénanthrène de 0,1 mg/L et possédant la plus faible teneur en biomasse aucun enrichissement n'est observé dans les fioles contenant le phénanthrène marqué par rapport à celle contenant le phénanthrène non marqué. Dans les fioles contenant, 1 et 3 mg/L de phénanthrène ¹³C, un léger enrichissement est observable dans les incubations contenant le phénanthrène ¹³C après 100 jours d'incubation.

Cependant, l'enrichissement observé est très faible et la composition isotopique mesurée est très proche de celle des incubations avec le phénanthrène non marqué, situé dans une fourchette basse par rapport aux valeurs des compositions isotopiques mesurées naturellement en digestion anaérobie (Keppler et al., 2010). Il semble donc que le phénanthrène ne soit pas totalement minéralisé sous forme de biogaz dans les conditions testées.

L'absence de minéralisation complète du composé n'entraîne pas forcément une absence de dégradation. Dans le but d'étudier si le phénanthrène n'a pas été partiellement dégradé durant les incubations, des analyses en RMN ont été réalisées sur la fraction dissoute et sur les matières en suspension. En fin d'incubation, il ne restait plus de phénanthrène dissout, ce qui suggère qu'il est fortement sorbé aux matières en suspension. Dans le but d'identifier une dégradation partielle du phénanthrène dans les incubations, la recherche de métabolites dans le dissous et le particulaire est en cours par GC-IRMS, LC-IRMS et RMN.

Dans le Chapitre IV, nous avons vu que la dégradation des HAP n'est pas reliée directement à la méthanogenèse tandis que d'autres travaux menés en batch (Cea-Barcia, 2012) ou en réacteur (Delgadillo, 2011) suggéraient que la dégradation des HAP pouvait être liée aux premières étapes d'hydrolyse, d'acidogenèse et d'acétogenèse de la digestion anaérobie, et notamment par des phénomènes de co-métabolisme. Or, nos expérimentations utilisant le phénanthrène marqué sont conçues de telle manière qu'elles ne favorisent ou permettent pas l'expression d'un tel co-métabolisme (travail à forte concentration en molécule marquée et avec une biomasse diluée afin de ne pas diluer le carbone 13 dans le carbone 12). Si l'expression d'un co-métabolisme est nécessaire à la minéralisation partielle ou totale du phénanthrène, pour favoriser sa réalisation, une autre source de carbone doit être introduite dans le milieu réactionnel. L'ajout d'un co-substrat (ex. cellulose ou glucose) pour favoriser la dégradation de la molécule marquée a donc été envisagé. Une fois la dégradation observée, l'analyse spatiale par spectrométrie de masse d'ion secondaire (NanoSIMS) pourrait permettre de co-localiser les bactéries ayant incorporé l'isotope stable avec celles qui auraient incorporé les co-substrats si celui-ci est lui-même marqué sur un autre atome que le carbone (Li et al. 2008).

V.2.2. Etude du potentiel de dégradation des molécules aromatiques

Afin d'étudier le potentiel microbien de dégradation de micropolluants organiques, nous avons choisi d'utiliser comme marqueur fonctionnel le gène *bssA* utilisé normalement comme marqueur de la dégradation anaérobie des molécules mono-aromatiques. Ce gène code pour une sous-unité de l'enzyme benzylsuccinate synthase qui permet l'ouverture des cycles aromatiques par addition d'une molécule de succinate. Les premières étapes du processus d'ouverture des cycles aromatiques lors de la dégradation des molécules poly-aromatiques ne sont actuellement pas décrites dans la littérature. Dans ce travail, nous avons recherché la présence du gène *bssA* par analogie avec les connaissances sur les voies de dégradation des molécules mono-aromatiques. Le nonylphénol présentant un seul noyau aromatique pourrait potentiellement être dégradé selon ce même type de voie. Les quelques connaissances acquises sur la dégradation de poly-aromatiques non substitués, comme les HAP, montrent que des méthylations ou carboxylations ont lieu sur les noyaux afin de les ouvrir, ce qui si la dégradation est avancée pourrait aboutir à des métabolites mono-aromatiques.

Le système de détection du gène *bssA*, mis point au laboratoire (Barret, 2009), a été mis en œuvre sur les extraits d'ADN obtenus à partir des sorties de réacteurs au TSH 5 et sur un témoin positif. Les conditions d'amplification sont les mêmes que celles utilisées pour l'amplification de la région V3 de l'ADNr 16S à la différence près que la température d'hybridation est abaissée à 51°C pour tenir compte de la température de fusion des amorces utilisées (Barret, 2009). Aucune amplification du gène *bssA* n'a été observée mis à part pour le témoin positif. Plusieurs conditions opératoires ont été testées et sont résumées dans le Tableau V-3. Dans le but de limiter l'action de possibles inhibiteurs d'amplification présents dans le mélange réactionnel, plusieurs dilutions de l'extrait d'ADN ont été testées. Pour tenter d'abaisser le seuil de détection du gène *bssA*, le nombre de cycles de PCR a été augmenté à 35 puis à 40. Quelles que soient les conditions opératoires testées, aucune amplification du gène *bssA* n'a été observée dans nos échantillons. L'augmentation du nombre de cycles et de la dilution des ADN a eu pour effet de générer des bandes aspécifiques sans toutefois qu'aucune bande n'apparaisse à la taille du fragment attendu (Figure V-8).

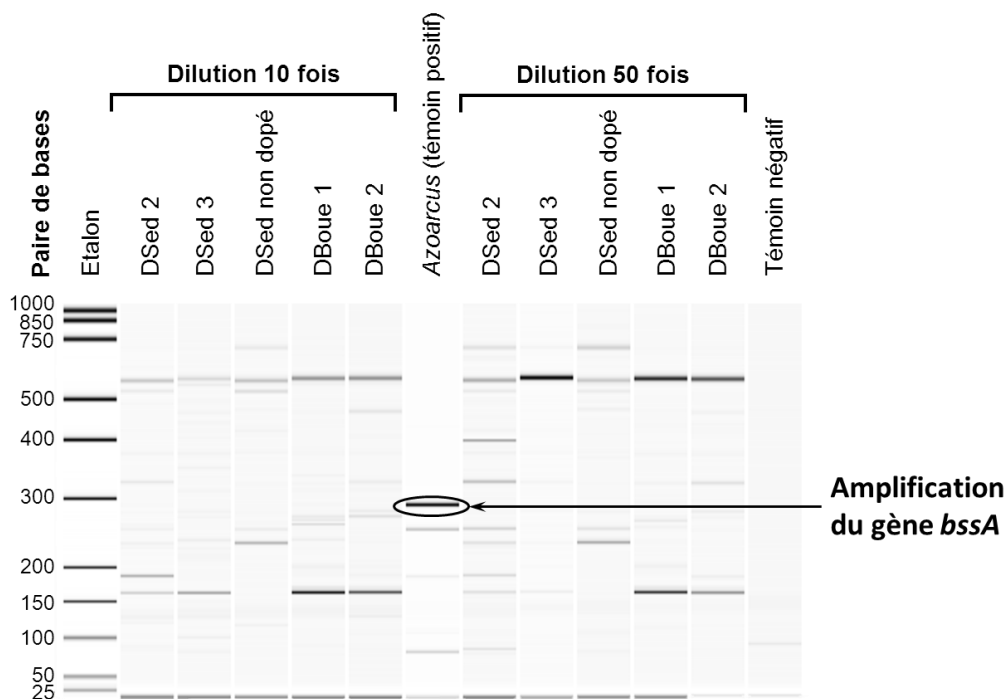


Figure V-8: Exemple d'essais d'amplifications du gène *bssA* d'échantillon de réacteurs à l'état d'équilibre

Essais d'amplification en utilisant 40 cycles de PCR.

Mise en évidence de bandes aspécifiques dans les échantillons d'amplification.

L'échec de la détection du gène *bssA* dans nos échantillons peut s'expliquer par différentes hypothèses :

- Le gène *bssA* n'est pas présent chez les microorganismes de nos échantillons. Le choix de ce gène comme marqueur d'une dégradation de molécule aromatique repose sur l'hypothèse forte que la dégradation des noyaux aromatiques des HAP, NP et PCB étudiée en conditions méthanogènes est liée à l'activité benzylsuccinate synthase. Or à ce jour, aucune expérience ne nous permet de valider cette hypothèse. Les abattements mesurés dans nos réacteurs font peut-être intervenir d'autres enzymes ou alors ils sont la résultante d'une dégradation partielle de la molécule mère et ne font donc pas intervenir le gène *bssA*, marqueur de la dégradation de molécule monoaromatique.
- Le gène *bssA* peut aussi être présent, mais à des niveaux inférieurs à la limite de détection. Les micropolluants étudiés représentent une source très faible de carbone et d'énergie dans nos systèmes. On peut donc supposer qu'un très faible pourcentage de l'ADN génomique extrait possède le gène *bssA*. Les concentrations en micropolluants utilisées dans nos systèmes, choisies pour être proches de la réalité des systèmes épuratoires ne permettent peut-être pas d'appliquer une pression de sélection suffisante qui aurait permis

d'enrichir nos systèmes en microorganismes capables d'utiliser les micropolluants comme source principale (et unique) de carbone et d'énergie.

Tableau V-3: Conditions d'amplification PCR testées pour le gène *bssA* et le gène *rdh*

Nb: nombre. Les paramètres d'amplification du gène *bssA* et du gène *rdh* tirés respectivement de (Barret, 2009) et (Park et al., 2011) sont représentés en gras.

Gène cible	T°C		Dilution
	hybridation	Nb cycles	
<i>bssA</i>	51°C	30	pur
<i>bssA</i>	51°C	30	10
<i>bssA</i>	51°C	35	10
<i>bssA</i>	51°C	35	50
<i>bssA</i>	51°C	40	10
<i>bssA</i>	51°C	40	50
<i>rdh</i>	52°C	35	pur
<i>rdh</i>	52°C	35	10
<i>rdh</i>	50°C	35	10
<i>rdh</i>	52°C	40	10
<i>rdh</i>	52°C	40	50

V.2.3. Etude de la présence de bactéries capables de déshalogénéation réductrice.

La déchloration réductrice par des microorganismes appartenant au phylum des *Chloroflexi*, et en particulier au genre *Dehalococcoides*, peuvent jouer un rôle important dans la détoxification naturelle de polluants fortement chlorés comme les PCB. La présence du gène *rdh* a été testée dans nos échantillons en utilisant un couple d'amorces « rdh4 » mis au point par Park et al. (2010). Ce couple d'amorces permet de détecter (par PCR) et de quantifier (par Q-PCR) la présence du gène *rdh* chez les bactéries du genre *Dehalococcoides* potentiellement capables donc de déchloration réductrice.

Le système de détection a été mis en œuvre sur les extraits d'ADN obtenus à partir des sorties de réacteurs dopés au TSH 5 (état d'équilibre) et sur un témoin positif.

Dans un premier temps, nous avons appliqué les conditions d'amplification PCR préconisées par Park et al. (2010), à savoir 35 cycles et une température d'hybridation de 52°C. Un unique produit PCR correspondant à la dimension du fragment attendu (autour de 260 pb) a alors été observé uniquement pour le témoin positif. Dans les autres échantillons, plusieurs bandes aspécifiques étaient détectées. Pour tenter d'abaisser le seuil de détection du gène *rdh*, le nombre de cycles de PCR a été augmenté à 40. Dans le but de limiter l'action de possibles inhibiteurs d'amplification présents dans le mélange réactionnel, une dilution plus forte des échantillons a été appliquée. L'ensemble des conditions de PCR testées sont résumées dans le Tableau V-3.

L'augmentation du nombre de cycles et la dilution de l'extrait d'ADN ont eu pour conséquence d'amplifier un surplus de fragments aspécifiques, sans toutefois qu'aucune bande n'émerge au même niveau que celle du témoin positif (Figure V-9).

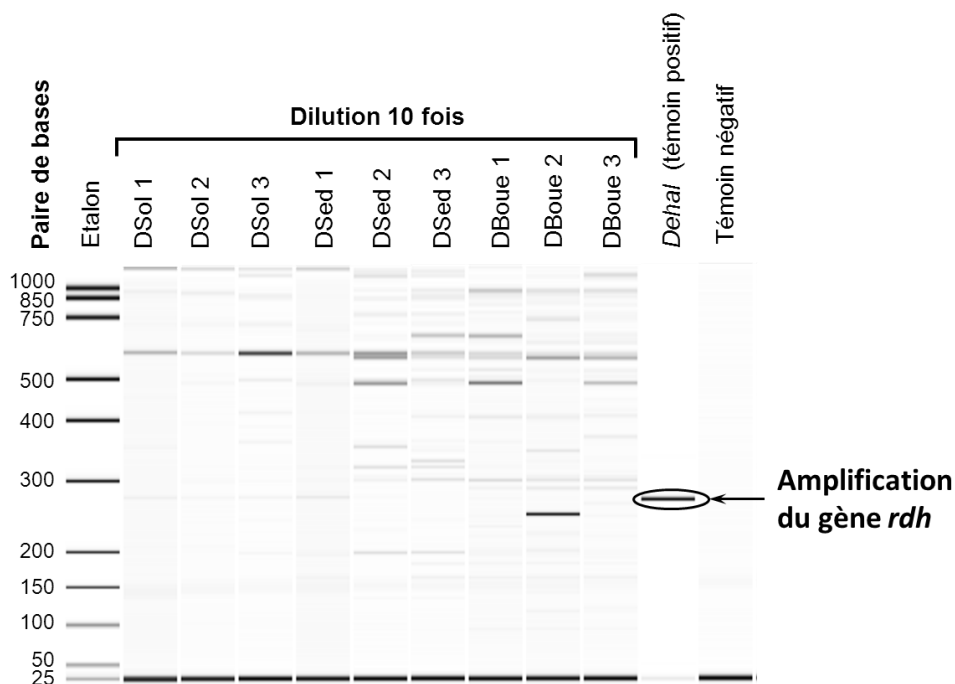


Figure V-9: Exemple d'essais d'amplifications du gène *rdh* d'échantillons de réacteurs à l'état d'équilibre

Essais d'amplification en utilisant 35 cycles de PCR et une température d'hybridation de 50°C.

Dehal : ADN extrait d'un enrichissement de *Dehalococcoides ethenogenes* 195.

Mise en évidence de bandes aspécifiques dans les échantillons d'amplification.

La détection et/ou la quantification de bactéries PCB réductrices du genre *Dehalococcoides* n'a donc pas abouti. L'étude des séquences identifiées par pyroséquençage, nous révèle que les bactéries affiliées au phylum de *Chloroflexi* étaient minoritaires dans nos réacteurs (représentant moins de 1% des séquences détectées). Les séquences associées à ce phylum ne représentaient qu'entre 0,04 et 0,2% des séquences retrouvées dans les réacteurs issus de l'écosystème boue. Par ailleurs, aucune séquence associées à ce phylum n'a été trouvée dans les autres réacteurs issus des sols et sédiments. De plus, il est à noter qu'aucune bactérie du genre *Dehalococcoides* parmi les séquences affiliées au phylum des *Chloroflexi* n'a été identifiée par pyroséquençage dans nos systèmes. Malgré tout, des abattements en PCB ont été enregistrés dans les trois types de réacteurs (DSol, DSed et DBoue). La présence de ce phylum ne peut donc expliquer à elle seule, les abattements en PCB mesurés dans nos systèmes. On peut donc fortement présumer du fait que le gène *rdh* est absent de nos systèmes. Il apparaît donc que la détection du gène *rdh* présent chez les bactéries du genre *Dehalococcoides* ne soit pas la bonne approche pour suivre les acteurs de la déchloration réductrice dans nos systèmes. Une approche phylogénétique visant à utiliser des amorces PCR permettant de

quantifier les bactéries du phylum *Chloroflexi* a aussi été envisagée. Au vu des résultats de pyroséquençage et de la rareté de ce phylum dans nos échantillons, on peut émettre des doutes quant à la pertinence d'une telle approche dans nos systèmes.

V.3. Conclusions

Dans ce chapitre, l'étude des populations microbiennes par pyroséquençage a confirmé les données obtenues par empreinte moléculaire et Q-PCR. A savoir ; (i) une discrimination des populations microbiennes selon les voies métaboliques empruntées avec la distinction de deux groupes homogènes distincts, DSol et DBoue, et un groupe DSed plus hétérogène ; (ii) une faible proportion d'archée méthanogène mais dont les variations d'abondance relative expliquent bien les différences de production de méthane enregistrée entre les réacteurs ; (iii) la présence de tous les groupes phylogénétiques connus dans les systèmes de digestion anaérobie ; (iv) l'absence de séquences affiliées au genre *Dehalococcoides* qui auraient pu signer la présence de bactéries potentiellement impliquées dans la dégradation des PCB.

Etudier les fonctions de dégradation de micropolluants organiques dans nos systèmes se révèle être assez compliqué. En effet, la dégradation des micropolluants organiques semble être une fonction minoritaire de nos écosystèmes et la détection des acteurs de cette fonction se heurte alors à des problèmes de seuil de détection. Les difficultés rencontrées peuvent être due (i) à la faible pression de sélection appliquée sur nos systèmes par des concentrations en micropolluants organiques faibles (mais rappelons le réaliste par rapport à celles rencontrées dans les systèmes épuratoire), (ii) au manque de connaissances et donc d'outils moléculaires permettant de détecter la présence des gènes codant pour les enzymes impliqués dans les processus de dégradation des molécules aromatiques en condition méthanogène.

Même si elle n'a pas permis de mettre en évidence une minéralisation du phénanthrène, l'approche par marquage isotopique de micropolluant utilisé comme substrat pourrait nous permettre (i) d'identifier les compartiments dans lesquels les microorganismes ont assimilé le micropolluant marqué, (ii) d'identifier des intermédiaires métaboliques de dégradation de la molécule, et enfin (iii) de présélectionner les microorganismes ayant incorporés le substrat marqué en vue de les identifier. Pour cela, il est peut-être nécessaire de favoriser, dans nos incubations, les processus de co-métabolismes, suspectés de jouer un rôle important dans la dégradation des HAP, en ajoutant dans le milieu réactionnel un co-substrat (cellulose ou glucose). Une autre stratégie serait de travailler avec des microorganismes provenant d'enrichissement à de plus fortes concentration sur phénanthrène.

Chapitre VI. RELATION ENTRE REPARTITION DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES ET ACTIVITE “PERTURBATEUR ENDOCRINIEN” DANS LES DIFFERENTS COMPARTIMENTS DE LA BOUE

Si l'origine des populations microbiennes, utilisées comme inocula, n'influence pas le devenir global des HAP dans nos systèmes, elle entraîne la réalisation de voies métaboliques majeures différentes (fermentaire et méthanogène). Ces voies métaboliques peuvent influencer les caractéristiques de la matière et peuvent potentiellement induire un effet, (i) sur la répartition des micropolluants au sein des différents compartiments de la boue, (ii) sur l'expression de toxicité différente selon les compartiments et (iii) sur les voies métaboliques mineures de dégradation et la production de métabolites à activité perturbatrice endocrinienne variable . Dans ce chapitre, nous étudierons donc à l'état d'équilibre, la répartition des micropolluants organiques et plus particulièrement celle des HAP au sein des compartiments matière du digestat ainsi que l'activité toxique qu'eux ou leurs métabolites peuvent générer.

VI.1. Avant-propos

Dans le Chapitre IV, nous avons vu que la dégradation des micropolluants et particulièrement celle des HAP à l'état d'équilibre convergeait vers la même valeur à l'état d'équilibre pour tous les inocula étudiés, indépendamment des voies métaboliques empruntées. Or suivant ces voies métaboliques, les caractéristiques du digestat peuvent varier et la répartition des micropolluants au sein des compartiments de cette matrice en être modifiée via les phénomènes de sorption. C'est pourquoi nous avons étudié la répartition des micropolluants dans les différents compartiments de la boue à l'état d'équilibre.

Les micropolluants peuvent se retrouver sorbés ou non à différents compartiments de la boue (Barret et al. 2010d). Barret et al distinguent trois états des micropolluants dans la boue, (i) les micropolluants sont sorbés à la matière particulaire (C_{part}), (ii) les micropolluants sont sorbés à la matière colloïdale et dissoute (DCM) du compartiment aqueux (C_{DCM}) et/ou (iii) les micropolluants sont à l'état libre (C_{libre}) dans le compartiment aqueux (Figure VI-1).

Dans le cas des boues, le modèle généralement adopté pour décrire la distribution d'un composé entre ses états libre et sorbé aux particules est celui de Freundlich régit par l'équation :

$$C_{part} = K_{part} \times (C_{aqu})^{\frac{1}{n}}$$

Avec C_{aqu} : concentration du composé dans la phase aqueuse ($\mu\text{g/L}$),

C_{part} : concentration du composé dans la phase particulaire ($\mu\text{g/kg}_{part}$),

K_{part} : constante de Freundlich (L/kg_{part}), aussi nommé K_d ou K_f ,

$\frac{1}{n}$: Coefficient de Freundlich égal à 1 quand la relation est linéaire

Pour chaque micropolluant organique, des constantes d'équilibre (si on considère un isotherme de type Freundlich avec $n=1$, soit donc linéaire) ou de partage peuvent être calculée entre le compartiment particulaire et libre (K_{part}) et entre le compartiment DCM et libre (K_{DCM}). K_{part} représente l'affinité du micropolluant pour le compartiment particulaire alors que K_{DCM} représente l'affinité du micropolluant pour le compartiment DCM.

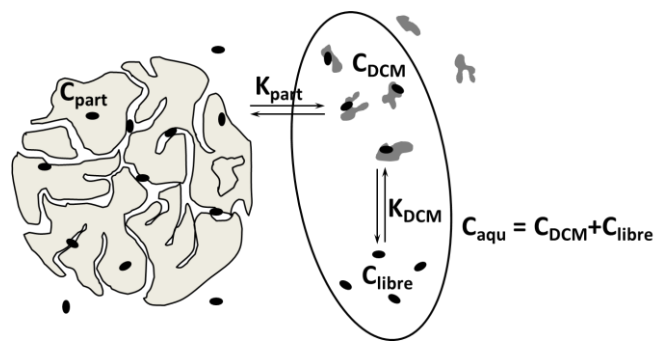


Figure VI-1: Répartition selon un système à trois compartiments d'un micropolluant organique d'après (Barret, et al. 2010d)

L'effet « perturbateur endocrinien » est mesuré à l'aide de bioessais. On définit alors une activité « toxique » de l'extrait étudié par rapport à une molécule de référence (§ II.5.4). Dans le but d'étudier l'influence combinée des populations microbiennes via le degré de digestion de la boue et de la dynamique des micropolluants sur les activités « perturbateurs endocriniens », l'activité « toxique » induite par chaque compartiment (boue totale, compartiment particulaire et compartiment aqueux) est mesurée par des tests biologiques sur des lignées cellulaires (§ II.5). Ces résultats obtenus en bioessais sont confrontés à ceux obtenus par l'analyse chimique des micropolluants dans les différents compartiments.

Ce chapitre est dédié à l'étude des répartitions des micropolluants dans les différents compartiments et des activités « perturbateur endocrinien » lorsque l'état d'équilibre est atteint et se focalise plus particulièrement sur les HAP. Nous définissons 4 types de boue :

- **Alim** : boue servant d'alimentation pour tous les réacteurs
- **DSol** : boue digérée provenant des réacteurs inoculés par les microorganismes extraits du sol
- **DSed** : boue digérée provenant des réacteurs inoculés par les microorganismes extraits du sédiment
- **DBoue** : boue digérée provenant des réacteurs inoculés par les microorganismes extraits de la boue

VI.2. Répartition des micropolluants organiques et affinité pour les différents compartiments.

Les concentrations pour chacun des HAP sont mesurées ou calculées dans le compartiment particulaire ($C_{i\ part}$), le compartiment aqueux ($C_{i\ aqu}$), la fraction dissoute et colloïdale ($C_{i\ DCM}$), dans la fraction libre ($C_{i\ libre}$) et dans la boue totale ($C_{i\ total}$).

VI.2.1. Influence des caractéristiques des molécules sur la répartition des micropolluants

Etudions dans un premier temps la répartition des micropolluants dans les différents compartiments par rapport à la concentration totale en micropolluant dans la boue (Figure VI-2).

La majorité des micropolluants présents dans la boue se retrouve dans le compartiment particulaire, indépendamment du composé étudié. Par contre, la concentration en micropolluants dans la phase aqueuse varie suivant les molécules étudiées mais les proportions de micropolluant dans cette phase aqueuse sont globalement faibles (inférieur à 6%). Dans le compartiment aqueux, les molécules les plus hydrophobes (log Kow les plus élevés) sont majoritairement retrouvées dans la fraction dissoute et colloïdale du compartiment alors qu'à l'inverse les composés les plus hydrophiles sont majoritairement présents sous forme libre.

VI.2.2. Influence des paramètres de fonctionnement des réacteurs sur la répartition des HAP dans les différents compartiments

De la même manière que les caractéristiques des molécules n'influencent pas la proportion de HAP sorbée à la matière particulaire, le fonctionnement des réacteurs n'induit pas de différence sur ces proportions. Qu'il s'agisse de la boue d'alimentation ou de des boues digérées, la majorité des micropolluants est retrouvée dans le compartiment particulaire. Par rapport à la concentration totale, toutes molécules confondues, la proportion de micropolluants présents dans la phase aqueuse est supérieure dans les boues digérées par rapport à la boue d'alimentation. La proportion de micropolluant présent dans la phase aqueuse est croissante entre DSol, DSed et DBoue. Les proportions en micropolluants dans la phase libre et dans la DCM augmentent conjointement selon le même classement.

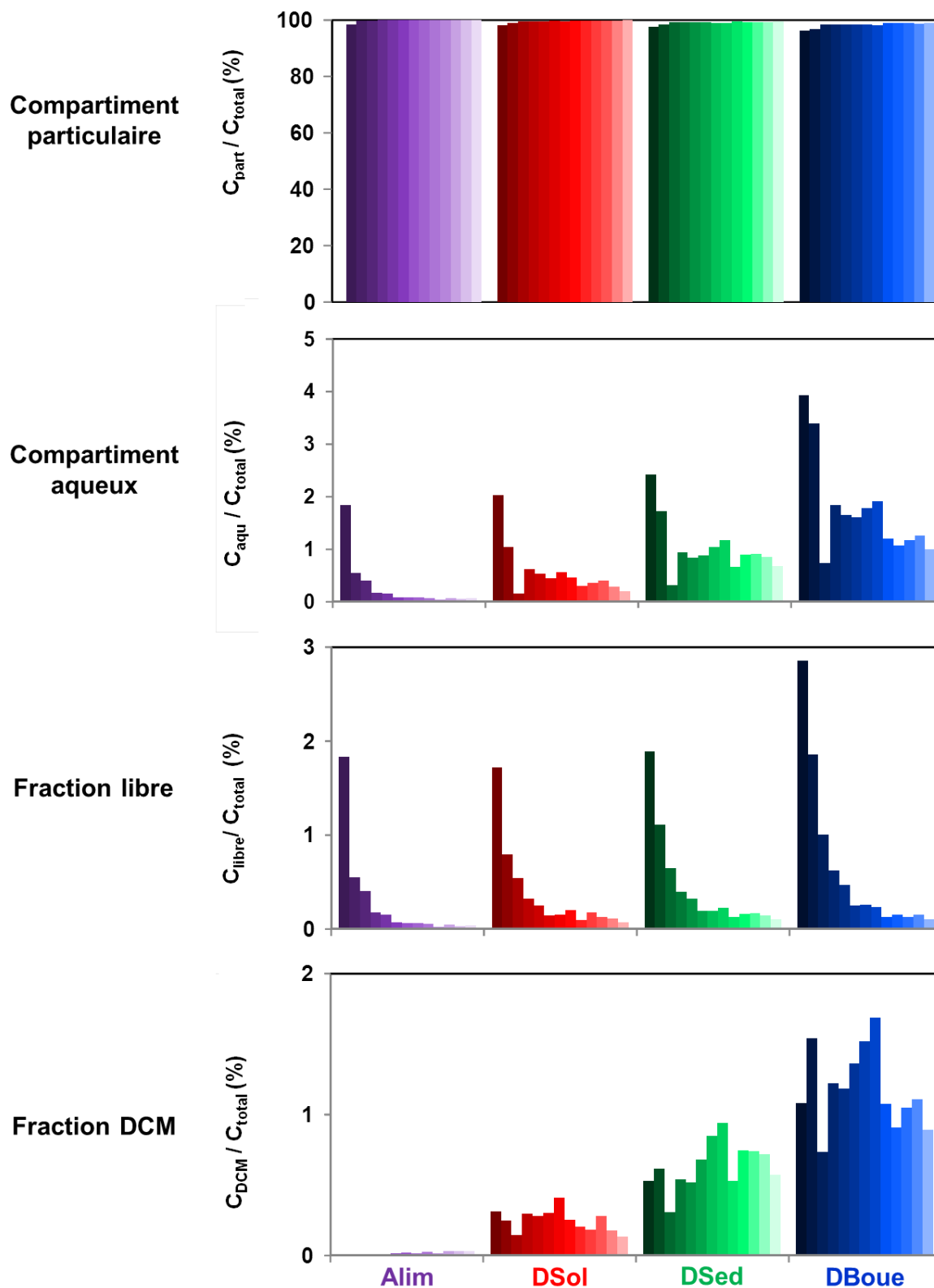


Figure VI-2: Répartition des HAP dans le compartiment particulaire et aqueux de la boue et dans les fractions libre et DCM du compartiment aqueux

Les proportions sont calculées par rapport au total des concentrations en micropolluant. Les micropolluants sont représentés de gauche à droite (du plus foncé au plus clair) par ordre croissant d'hydrophobicité ($\log K_{ow}$).

■ Flu ■ Ant ■ Phe ■ Fluor ■ Pyr ■ BaA ■ Chr ■ BaP ■ BbF ■ Ind ■ BkF ■ DBA ■ BghiP

L'étude de la répartition des HAP dans la phase aqueuse, révèle que dans les boues digérées, les micropolluants sont présents de manière plus importante dans la fraction DCM que dans la fraction libre (Figure VI-3). Là encore le phénomène est accentué entre les trois types de réacteurs.

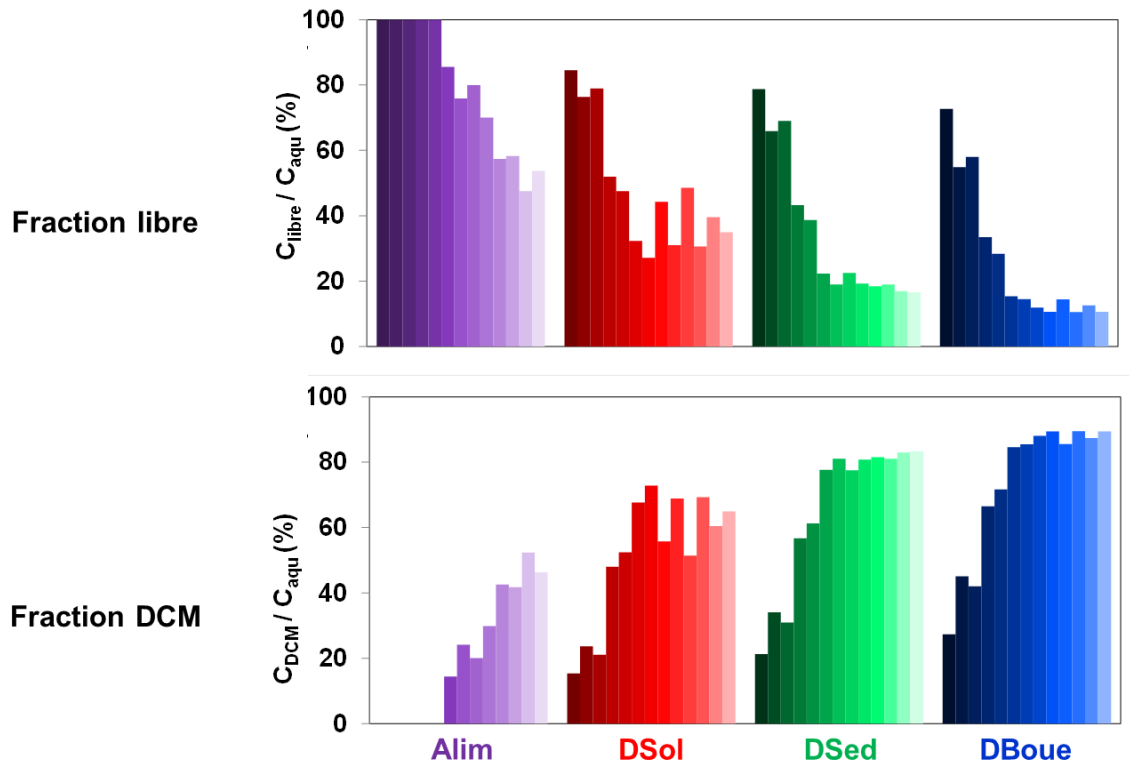


Figure VI-3: Répartition des HAP dans la fraction libre et DCM au sein du compartiment aqueux

Les proportions sont calculées par rapport au total des concentrations en micropolluant dans le compartiment aqueux. Les micropolluants sont représentés de gauche à droite (du plus foncé au plus clair) par ordre croissant de log Kow:

■ Flu ■ Ant ■ Phe ■ Fluor ■ Pyr ■ BaA ■ Chr ■ BaP ■ BbF ■ Ind ■ BkF ■ DBA ■ BghiP

La digestion anaérobie de la boue entraîne donc un réarrangement de la répartition des micropolluants. Les effets de ce réarrangement sont plus importants dans la phase aqueuse. Ce réarrangement est influencé par le fonctionnement des réacteurs. Si l'on compare les réacteurs où la méthanisation se déroule normalement (DBoue) aux réacteurs où d'autres voies métaboliques sont impliquées dans la dégradation de la matière (DSol), on peut émettre l'hypothèse que plus la digestion de la matière est poussée, plus les micropolluants se retrouvent dans la phase aqueuse. Dans cette phase, le processus de digestion va entraîner une accumulation des micropolluants sur la fraction DCM.

Les réacteurs, étant tous alimentés avec le même type de boue (Alim), la disponibilité initiale des micropolluants est identique pour tous les écosystèmes étudiés. Les bactéries sont soumises à une répartition en micropolluants similaire dans tous les écosystèmes,

induite par les caractéristiques de la boue d'alimentation. Les micropolluants sont essentiellement présents dans le compartiment particulaire. Au cours de la digestion, les HAP sont dégradés mais ceux qui restent vont se répartir différemment dans les compartiments suivant différentes affinités des micropolluants, induites par la composition physico-chimique de chacun de compartiments.

VI.2.3. Evolution des affinités des micropolluants organiques pour les différents compartiments

Pour étudier les interactions entre la boue et les micropolluants, des constantes de partage, appelées aussi constantes d'affinité sont calculées selon les expressions présentés dans le paragraphe II.7.1. Pour un composé donné, à partir des concentrations C_{part} et C_{libre} , nous définissons une constante K_{part} représentant l'affinité de la molécule pour le compartiment particulaire. K_{DCM} , établie à partir des concentrations DCM et C_{libre} , représente quant à elle, l'affinité du micropolluant pour le compartiment DCM.

La comparaison des boues digérées et de la boue d'alimentation révèle que dans les boues digérées, les micropolluants ont une affinité plus faible pour le compartiment particulaire mais plus forte pour le compartiment DCM (Figure VI-4).

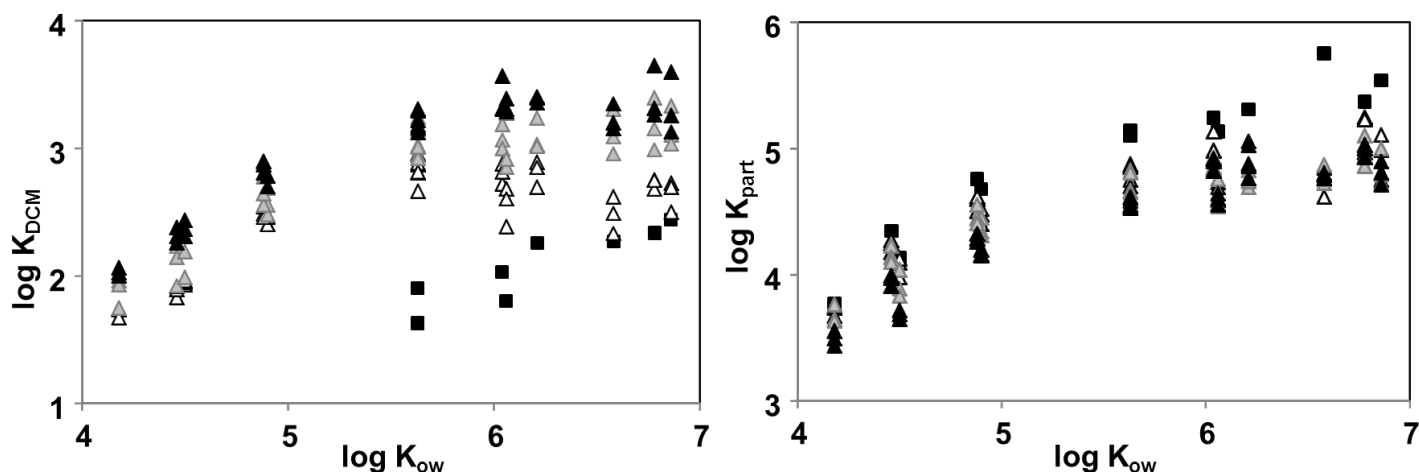


Figure VI-4: Affinité des HAP vis-à-vis du compartiment DCM et du compartiment particulaire (exprimé respectivement en $\log K_{DCM}$ et $\log K_{part}$) en fonction de l'hydrophobicité des micropolluants (exprimé en $\log K_{ow}$) dans nos différentes boues (■ Alim, △ DSol, △ DSed, ▲ DBoue)

Ces différences d'affinité pour le compartiment DCM expliquent celles observées sur la répartition des HAP dans la phase aqueuse. En effet, dans la boue d'alimentation, les micropolluants ont peu d'affinité pour le compartiment DCM, il est donc logique de les retrouver en proportion plus faible dans ce compartiment et plus forte dans la fraction libre. A l'inverse, dans les boues digérées, l'affinité des micropolluants augmente pour le compartiment DCM, leur concentration dans ce compartiment augmente donc aussi.

La comparaison des boues digérées entre elles, révèle que, dans DBoue, les micropolluants ont plus d'affinité pour le compartiment DCM par rapport à DSol et DSed. De la même manière que précédemment ces différences s'expliquent par les différences de répartition des micropolluants observées dans la phase aqueuse entre les boues digérées. L'affinité des micropolluants pour la DCM étant plus forte pour les échantillons DBoue, il est logique d'y retrouver des concentrations plus importantes. Par contre l'affinité des micropolluants pour le compartiment particulaire semble inchangée.

Pour un composé donné, les variations d'affinité observées entre boues digérées et boue d'alimentation mais aussi inter-boues digérées peuvent être liées à une modification des propriétés physico-chimiques des différents compartiments. L'affinité plus forte, pour le compartiment DCM, dans le cas des boues digérées, est une conséquence des transformations de la matière durant la digestion anaérobie (Barret et al. 2010c). Les changements physico-chimiques, s'opérant pendant la digestion, peuvent alors générer une modification des interactions micropolluants-matrice.

Dans ses travaux de thèse, Maialen Barret (2009), a comparé les caractéristiques d'une boue digérée et d'une boue non digérée par la fluorescence 3D. Elle obtient ainsi des spectres de fluorescence pour chacune des boues et met en évidence des différences de nature fonctionnelle de la matrice constituant la fraction DCM avant et après digestion (Figure VI-5). Dans son étude, l'auteur suggère que l'îlot correspondant aux substances *humique-like* entrainerait une capacité de sorption plus forte de la DCM. Par ailleurs, dans ses travaux de thèse, Glenda Cea-Barcia (2012) confirme cette hypothèse en démontrant l'importance de cette fraction fonctionnelle. En effet en construisant un modèle explicatif des variations du K_{DCM} en fonction des caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles de la boue, cet auteur démontre que l'îlot, représentant les substances *humique-like*, est un paramètre explicatif important des variations du K_{DCM} des micropolluants organiques présents ce compartiment. Par ailleurs, cet auteur souligne que d'autres îlots de fluorescence comme celui des substances *mélanoidines* et *ligno-cellulosiques-like*, mais aussi l'îlot caractérisant les protéines, sont aussi des paramètres influençant l'affinité pour ce compartiment DCM.

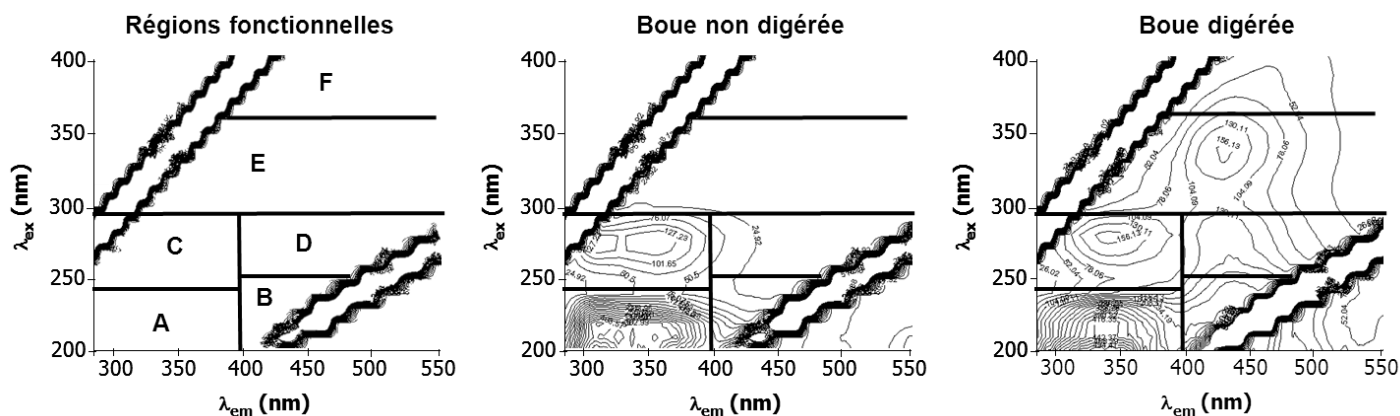


Figure VI-5: Spectre de fluorescence 3D des phases aqueuses d'une boue non digérée et d'une boue digérée d'après (Barret, 2009)

Zone A: Protéines aromatiques-like, Zone B: Acides fulviques-like, Zone C: Tryptophane-like, Zone D: Protéines-mélanoïdines, Zone E : Mélanoïdines-like et ligno-cellulose-like, Zone F : Acides humiques-like

Dans notre cas, l'hypothèse serait que la digestion anaérobie des boues entraîne, comme dans les études précédentes, la formation de composés type *humique-like* favorisant ainsi la sorption des HAP au compartiment DCM, en augmentant l'affinité de ceux-ci pour ce compartiment. Les différences observées entre les boues digérées (pour un inoculum provenant du sol, d'un sédiment et d'une boue) pourraient être dues à des variations de présence des composés *humique-like* dans le compartiment aqueux, suivant l'efficacité de la digestion anaérobie. Pour mieux expliquer les variations d'affinité du K_{DCM} de nos échantillons, il serait très intéressant de pouvoir caractériser la phase aqueuse de nos différentes boues digérées par une analyse en fluorescence 3D. Ces analyses nous permettraient d'appréhender les variations fonctionnelles du compartiment DCM en fonction des voies métaboliques et donc du degré de digestion de nos 3 types de réacteurs. Elles nous permettraient de mieux expliquer les variations des K_{DCM} et de répartition des micropolluants dans nos échantillons.

L'affinité des micropolluants pour la DCM peut aussi être influencée par les caractéristiques physico-chimiques de celle-ci. La valeur de la DCO_{DCM} peut être un bon indicateur de changements physico-chimiques dans cette fraction. Si on calcule cette valeur en prenant soin d'y soustraire la part imputable aux AGV, des différences entre $DSol$ et $DBoue$ apparaissent (Tableau VI-1). Plus la valeur de DCO est faible, plus la matière est oxydée et condensée et donc plus la sorption est forte (Barret et al., 2010c). Une augmentation de la concentration en DCO_{DCM} peut donc entraîner une diminution du K_{DCM} . Or, dans nos échantillons de boue digérée, les concentrations en DCO_{DCM} varient. La DCO_{DCM} de $DBoue$ est significativement plus faible que celle de $DSol$. Ces résultats concordent avec une augmentation du K_{DCM} dans $DBoue$ par rapport à $DSol$ et peuvent renforcer aussi notre hypothèse que l'affinité des micropolluants pour la DCM augmente avec le degré de digestion (de stabilisation) de la matière.

Tableau VI-1: DCO du compartiment DCM dans les différentes boues digérées

Les valeurs de DCO_{DCM} sont corrigées en soustrayant à la mesure de DCO du compartiment aqueux la concentration en AGV calculée en DCO-EQ. Les indices 1,2,3 représentent chacun des triplicats de réacteur.

Type de boue	DCO _{DCM}
DSol ₁	1,948395
DSol ₂	1,824565
DSol ₃	2,299665
DSed ₁	1,725455
DSed ₂	1,816755
DSed ₃	1,36978
DBoue ₁	1,38581
DBoue ₂	1,394155
DBoue ₃	1,31345

VI.3. Activité des perturbateurs endocriniens dans les différents compartiments

Les activités « perturbateur endocrinien » sont évaluées dans la boue totale, dans le compartiment particulaire et dans le compartiment aqueux. Les activités œstrogéniques, androgéniques, *dioxin-like* et *HAP-like* pouvant toutes quatre être modulées par la présence de HAP, PCB ou NP, sont évaluées à partir de test sur différentes lignées cellulaires (II.5). Les activités ciblées font partie de celles classiquement trouvées dans la littérature pour décrire l'action de molécules pouvant induire une activité de perturbateur endocrinien, à la fois dans des études sur des procédés de traitement et de valorisation (Combalbert et al. 2012; Patureau et al. 2008b) mais aussi dans des études sur des échantillons environnementaux (Kinani et al. 2010). Chaque activité est mesurée par rapport à une molécule de référence. Il s'agit du 17 β -œstradiol (E2) pour l'activité œstrogénique, de la dihydrotestostérone (DHT) pour l'activité androgénique, de la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) pour l'activité *dioxin-like* et le Benzo(a) Pyrène (BaP) pour l'activité *HAP-like*. Les différentes activités mesurées sont présentées sur la figure VI-6.

De façon générale, les activités mesurées dans le compartiment « boue totale » sont plus élevées ou équivalentes à celles mesurées dans le compartiment particulaire ; ces dernières sont à chaque fois supérieures à celle mesurée dans le compartiment aqueux, ce qui coïncide bien avec le fait que les micropolluants organiques soient sorbés majoritairement au compartiment particulaire.

Mise à part l'activité androgénique pour laquelle aucune activité « boue totale » n'est mesurée et l'activité *dioxin-like*, il est difficile de différencier l'activité « boue totale » de la boue d'alimentation, de celle des boues digérées. Par contre des différences sont observables à la fois dans le compartiment particulaire et dans le compartiment aqueux

entre boue d'alimentation et boues digérées avec soit une augmentation, soit une diminution d'activité entre alimentation et sortie.

Dans le compartiment particulaire, la boue des réacteurs provenant des inocula « boue » (DBoue) possède des activités œstrogéniques, androgénique et *HAP-like* proches de la boue d'alimentation, alors que la boue provenant des réacteurs inoculés avec des microorganismes venant du sol (DSol) possède à chaque fois une activité supérieure. La boue provenant de l'inoculum « sédiment » (DSed) possède un comportement intermédiaire entre DBoue et DSol. Ces résultats suggèrent que, dans le cas d'une digestion incomplète de la boue, il se forme des composés intermédiaires qui interagissent avec les différents récepteurs de nos modèles cellulaires.

Dans le compartiment aqueux, il est difficile de différencier les types de boue selon leur activité œstrogénique. Par contre, les activités androgéniques et *HAP-like* sont différentes selon le type d'inoculum étudié. L'activité androgénique de DBoue est similaire à celle mesurée dans l'alimentation alors qu'elle est supérieure dans DSol. Par opposition, l'activité *HAP-like* mesurée dans l'alimentation est similaire à celle mesurée dans DSol et nettement inférieure à celle mesurée dans DBoue. Peu d'activité *dioxin-like* est mesurée dans le compartiment aqueux

L'activité androgénique est la seule pour laquelle, des activités sont mesurées dans les compartiments particulaire et aqueux, sans que des activités soient mesurées dans le compartiment totale. Ce phénomène peut être dû à des actions agonistes (effet positif sur le récepteur) et antagonistes (effet négatif sur le récepteur) qui mèneraient à une absence d'activité générale mesurée dans la boue. Des tests pour déterminer la possible présence d'action antagoniste sont en cours d'analyse.

Dans le cas de l'activité *dioxin-like*, certaines activités mesurées dans le compartiment particulaire sont supérieures à celles mesurées dans le compartiment total. Ici aussi des actions agonistes et antagonistes peuvent survenir. Les PCB notamment peuvent jouer des rôles différents sur le récepteur AhR suivant la conformation des molécules (Chen et Bunce, 2004).

Dans le cas des activités œstrogéniques, en combinant les analyses chimiques, qui nous renseignent sur les concentrations en NP obtenue dans la boue totale, avec les analyses biologiques, nous pouvons comparer les équivalents toxiques donnés par les analyses chimiques et biologiques. Nos calculs (données non présentées) nous révèlent que pour tous les échantillons seul 0.1 à 0.3% de l'activité mesurée biologiquement sont expliqués par les concentrations en NP mesurées. A concentration égale cette molécule induit une activité presque un million de fois plus faible que le 17 β -œstradiol. Ce dernier composé (non dosé dans notre étude) peut être retrouvé dans les boues dans des concentrations allant de 10 à 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Muller et al. 2010) ce qui représenterait 15 à 30% de l'activité mesurée.

De nombreux composés peuvent agir sur le récepteur ER comme, par exemple des hormones œstrogènes (naturelles ou synthétiques) des métabolites des HAP ou du Bisphénol-A (Kinani et al. 2010).

L'activité *HAP-like* est sans conteste l'activité la plus présente dans nos échantillons, avec des valeurs jusqu'à 1000 fois supérieures aux autres valeurs d'activités « perturbateur endocrinien ».

Dans la suite de ce paragraphe, nous mettons volontairement à part les réacteurs inoculés avec des microorganismes issus de sédiments qui ont un comportement métabolique hétérogène et intermédiaire par rapport aux réacteurs inoculés par des microorganismes de sol et de boue.

De manière générale sur les échantillons totaux, si l'on compare les échantillons de boue digérée à l'échantillon d'alimentation, bien que nous mesurons des abattements en HAP, nous n'enregistrons ni perte, ni surplus d'activité *HAP-like*. Des molécules mères HAP ayant pourtant été éliminées de la boue, cela peut suggérer une activité *HAP-like* des produits de dégradation de la matière ou des HAP.

D'un point de vue qualitatif, si l'on compare donc les réacteurs ayant les comportements les plus différents (DSol et DBoue), les activités biologiques, observées sur les échantillons, semblent bien liées aux concentrations totales en HAP quantifiées dans les différents compartiments (Tableau VI-2). En effet, dans la boue totale, les concentrations en HAP sont similairement élevées indépendamment du type de boue (t-test, $p > 0.05$) et les activités *HAP-like* le sont aussi (t-test, $p > 0.05$). Dans le compartiment aqueux, les concentrations les plus fortes en micropolluants sont mesurées dans les échantillons DBoue et c'est là aussi que les activités *HAP-like* les plus fortes sont mesurées (cor=0.909, p-value=0.012). Par opposition, dans ce même compartiment, dans les échantillons DSol, les concentrations en HAP sont les plus faibles, et les activités *HAP-like* le sont aussi. Dans le compartiment particulaire où les concentrations en HAP sont plus fortes dans DSol que dans DBoue, là encore les activités suivent les tendances des concentrations (cor=0.947, $p = 0.004$) et l'on mesure des activités plus fortes dans le particulaire de DSol que dans le particulaire de DBoue.

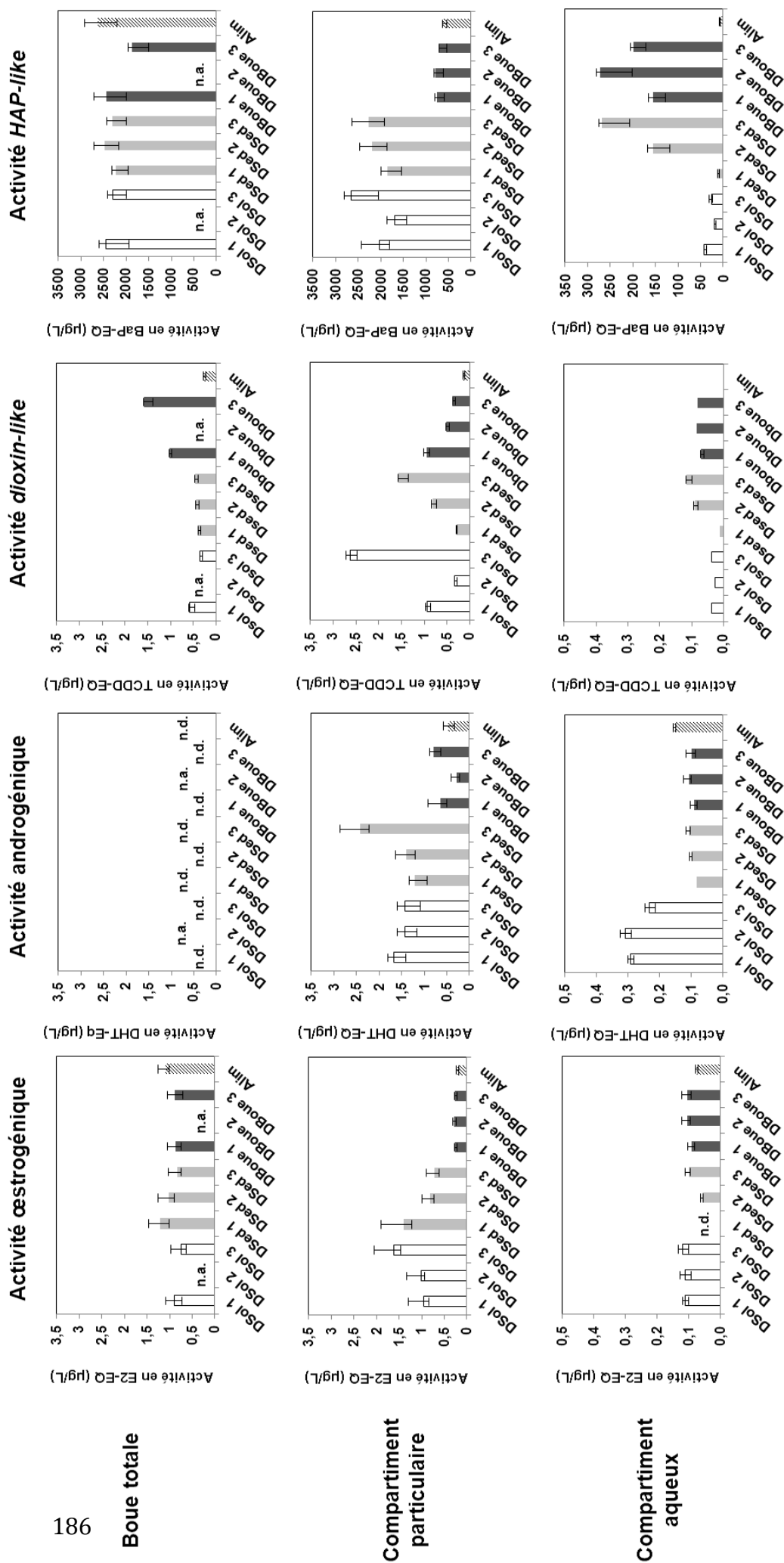


Figure VI-6: Comparaison de quatre activités "perturbateur endocrinien" représentatives mesurées dans des extraits de micropolluants issus des différents compartiments de chaque réacteur à l'équilibre

Activité mesurée dans la boue d'alimentation des réacteurs dopés (hatched bar) dans les boues digérées par les réacteurs inoculés par des microorganismes provenant du sol (white bar), des sédiments (grey bar) et de la boue (hatched bar). n.a., non analysée, ; n.d., non détectée

Tableau VI-2: Comparaison entre concentrations en HAP et activité *HAP-like* dans les boues digérées DSol et DBoue

Concentrations moyennes(en µg/L) et activités moyennes (en µg Eq-BaP/L) sur les trois réplicats de réacteurs

Réacteur	C _{ech totale}	<i>HAP-like</i> _{ech total}	C _{part}	<i>HAP-like</i> _{part}	C _{aqu}	<i>HAP-like</i> _{aqu}
DSol	922,6 ± 7	2371,6 ± 115	954,1 ± 24	2128,2 ± 498	4,8 ± 1	29,2 ± 12
DBoue	837,8 ± 18	2155 ± 394,9	735,8 ± 18	746,5 ± 50	12,0 ± 1	208,8 ± 60

En combinant les analyses chimiques, qui nous renseignent sur les concentrations en HAP dans chaque compartiment, avec les analyses biologiques, nous pouvons comparer les équivalents toxiques données par les analyses chimiques et biologiques. Pour ce faire nous calculons pour chaque réacteur les équivalents toxiques théoriques mesurés grâce aux dosages chimiques. Pour calculer ces équivalents toxiques, nous utilisons les coefficients de toxicité de chaque molécule sur la lignée cellulaire PLHC1 (Louiz et al., 2008). Les données pour chaque réacteur et molécules sont présentées dans l'**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Pour chaque réacteur, une valeur correspondant à l'activité toxique générée théoriquement par l'ensemble des 13 HAP (Chem-BaP) est calculée et comparée à la valeur mesurée biologiquement (Bio-BaP-EQ). A partir de ces données, le pourcentage d'activité mesurée expliqué par les mesures chimiques peut être calculé.

Pour toutes les boues étudiées, les concentrations en HAP mesurées dans la boue totale expliquent 36 ± 3 % de l'activité *HAP-like* (Tableau VI-3). Ces pourcentages sont cohérents avec ceux trouvés dans la littérature sur la mesure d'activité *HAP-like* dans des échantillons contaminés par un cocktail de molécules (Kinani et al. 2010). Les ligands naturels de AhR sont peu connus mais d'autres molécules peuvent interagir avec ce récepteur tel que des HAP méthylés, des PCB ou des acides humiques (Brack et al. 2008; Louiz et al. 2008; Kinani et al. 2010). Par ailleurs, d'autres HAP (ou d'autres isomères), non mesurés dans notre étude, peuvent aussi être présents dans la boue et donc induire une activité toxique.

Dans le compartiment particulaire, de manière générale, les données de la chimie expliquent mieux l'activité mesurée biologiquement que dans la boue totale. Les autres molécules pouvant agir sur le récepteur AhR pourraient donc être plus présentes dans le compartiment aqueux. Le pourcentage d'activité expliquée par les concentrations en HAP mesurée est différent suivant le type de boue étudiée (Tableau VI-3).

Si l'on compare les deux types de réacteurs, ayant des comportements fermentaires les plus éloignés (soit DSol et DBoue), l'activité *HAP-like* calculée à partir des mesures chimiques explique mieux celle mesurée biologiquement dans le cas de DBoue que dans le cas de DSol. La digestion est plus poussée dans DBoue que dans DSol. Notre hypothèse serait donc que dans le cas d'une digestion incomplète de la boue, la dégradation des

HAP ne se fait pas non plus de manière complète et des métabolites intermédiaires de cette dégradation (comme des HAP méthylés) se formeraient. Ils resteraient sorbés au particulaire et pourraient donc induire une activité du récepteurs AhR. Dans le cas d'une digestion complète, la dégradation des HAP serait plus poussée et les produits de dégradation ne seraient pas sorbés au compartiment particulaire, ne pouvant donc induire une activité du récepteur AhR. La grande majorité des molécules mères HAP restant dans le particulaire expliqueraient donc la grande majorité de l'activité biologique mesurée. Une analyse des métabolites présents dans chacune des boues, nous permettrait d'infirmer ou non cette hypothèse. Le fait que les concentrations chimiques surestiment l'activité mesurée dans la boue d'alimentation peut être due à la présence de molécules antagonistes du récepteur AhR dans la boue d'alimentation. Ces molécules seraient alors transformées lors de la digestion ou leur action inhibée.

Les activités mesurées dans le compartiment aqueux sont plus faibles que dans le compartiment particulaire, de manière générale. Ces activités *HAP-like* sont plus faiblement expliquées dans ce compartiment que dans la boue totale (Tableau VI-3). Cela renforce notre hypothèse que d'autres molécules capables d'induire l'activité *HAP-like* mesurée dans la boue totale seraient donc préférentiellement présentes dans le compartiment aqueux.

VI.4. Conclusion

Les micropolluants sont majoritairement répartis dans le compartiment particulaire pour tous les types de boue (digérée ou non) et comportements métaboliques (fermentaire ou méthanogène). La répartition des HAP dans le compartiment aqueux varie d'une boue non digérée à une boue digérée mais aussi entre boues digérées. La digestion augmente la proportion des HAP présents dans le compartiment aqueux et plus particulièrement sorbés à la DCM. La digestion entraîne donc un réarrangement de la répartition des HAP dans le compartiment aqueux. L'affinité des HAP pour le compartiment DCM augmente avec le degré de digestion de la boue, il est donc logique de retrouver des proportions plus importantes de HAP sorbés à la DCM. Cette modification de l'affinité des HAP pour le compartiment DCM peut être expliqué par les modification physico-chimiques et fonctionnelles de la nature de la DCM qui surviennent lors de la digestion (Barret 2009; Cea-Barcia, 2012). Des analyses permettant de caractériser la composition biochimique du compartiment aqueux et ses transformations, notamment la fluorescence 3D, semble une perspective intéressante.

Tableau VI-3: Activités HAP-like calculées et mesurées (en BaP-EQ) dans la boue totale et dans les compartiments (particulaire et aqueux) à l'état d'équilibre

	DSol 1	DSol 2	DSol 3	DSed1	DSed2	DSed3	DBoue1	DBoue2	DBoue3	Alim
Activité calculée	771	n.a.	848	787	852	824	809	n.a.	785	955
Activité mesurée	2453	n.a.	2291	2223	2470	2310	2434	n.a.	1876	2615
Activité calculée/Activité mesurée (%)	31	n.d.	37	35	35	36	33	n.d.	42	37
Activité calculée	845	819	833	768	829	776	690	683	664	944
Activité mesurée	2036	1683	2666	1861	2201	2262	762	787	691	632
Activité calculée/Activité mesurée (%)	42	49	31	41	38	34	91	87	96	149
Activité calculée	2	2	4	4	11	6	10	9	8	1
Activité mesurée	42	20	26	11	154	268	155	273	199	9
Activité calculée/Activité mesurée (%)	5	11	15	39	7	2	7	3	4	6

Les activités « perturbateur endocrinien » ne permettent pas de différencier les différents types d'échantillons de boue si l'on considère l'échantillon de boue brut. D'un point de vue qualitatif, les activités *HAP-like* mesurées dans les compartiments suivent bien les variations des concentrations en HAP dans le compartiment particulaire et aqueux. La comparaison des activités biologiques *HAP-like* mesurées, à celle des activités théoriques calculées, nous permet de conclure quant à la présence d'autres molécules capables d'agir sur le récepteur cellulaire.

Les résultats obtenus sur le compartiment particulaire en comparant deux boues (DSol et DBoue) résultant d'une activité microbienne différente laissent supposer la présence dans ce compartiment d'intermédiaires de dégradation des HAP sorbés à la matière particulaire et pouvant induire une activité biologique sur les récepteurs AhR (il pourrait s'agir par exemple de HAP méthylés).

Ces intermédiaires métaboliques pourraient être de caractéristiques chimiques différentes suivant la voie de dégradation empruntée par le système. Notre hypothèse est que dans le cas des réacteurs DSol, ces intermédiaires, aux caractéristiques encore proches de la molécule mère, resteraient sorbés au compartiment particulaire. Dans le cas des réacteurs DBoue, où la digestion est plus poussée, on peut supposer une dégradation plus avancée des molécules mères HAP, formant ainsi des métabolites plus solubles ou ayant plus d'affinité pour le compartiment DCM. Ce qui engendrerait les activités plus fortes mesurées dans le compartiment aqueux de DBoue.

Par ailleurs, les modifications physico-chimiques induites par la digestion sur la nature des compartiments entraînent une affinité plus forte des HAP non dégradés pour le compartiment DCM. Ceci explique aussi l'augmentation d'activité mesurée dans ce compartiment dans les échantillons DBoue.

Selon les profils d'activités obtenus, une approche « Effect-Directed Analysis » (EDA), intégrant des analyses chimiques, guidées par les tests sur lignée cellulaire, peut être mis en œuvre dans le but d'identifier les molécules responsables des effets toxiques observés. Des échantillons d'intérêt DSol et DBoue, représentant des deux comportements métaboliques observés (fermentaires et méthanogène), pourront être fractionnés en fonction de la polarité ou de la masse des composés présents. L'activité de chaque fraction, ainsi obtenue, pourra être mesurée ce qui permettra d'identifier celles induisant une perturbation endocrinienne. Ces dernières seront alors isolées et analysées, par différentes techniques de spectrométrie de masse à haute résolution (GC-TOF et/ou LC-TOF). Ceci permettra la détection d'éventuels composés actifs, non ciblés par notre démarche d'analyse classique.

In fine, le couplage des analyses chimiques et toxicologiques devrait permettre d'identifier les composés ainsi que les classes chimiques, responsables d'une activité de perturbation endocrinienne, dans les échantillons de boue et leurs compartiments et/ou

fractions. Cela permettra aussi d'appréhender l'effet de la digestion et des comportements métaboliques exprimés par les communautés microbiennes, sur ces éléments.

L'analyse de l'activité induite par les échantillons issus des réacteurs non dopés, nous permettrait de vérifier que le processus de dégradation même de la matière, entraîne ou non une activité sur les différents récepteurs.

Notre analyse s'est essentiellement focalisée sur les HAP, mais analyser la répartition des PCB et des NP dans les différents compartiments, nous permettraient de mieux comprendre les activités « perturbateur endocrinien » mesurées en lien avec la dynamique de répartition de ces micropolluants dans les compartiments en fonction des comportements métaboliques exprimés par les trois communautés microbiennes.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était d'apporter un éclairage nouveau sur les acteurs microbiens et les processus impliqués dans la dégradation de micropolluants organiques au cours de la digestion anaérobie en utilisant les caractéristiques de la communauté microbienne initiale comme seule variable opératoire.

Dans un premier temps, il a été nécessaire de mettre au point un nouveau protocole expérimental permettant d'extraire les communautés microbiennes d'intérêt de leur écosystème natif tout en conservant les caractéristiques initiales (densité, diversité et activité). Ce protocole a permis d'étudier l'influence des communautés microbiennes placées dans les mêmes conditions physico-chimiques en réacteur continu (alimentation en substrat, température, taux de dilution, etc.). Si les protocoles d'extraction existant dans la littérature ont pu être facilement adaptés aux matrices de sol et de sédiment, la nature même de l'échantillon de boue, et particulièrement la présence de la gangue d'exopolymères (EPS), a nécessité la mise au point d'un protocole spécifique couplant un traitement enzymatique avec une extraction sur gradient de densité.

Pouvoir extraire spécifiquement des communautés microbiennes d'écosystèmes complexes tout en minimisant l'impact de l'extraction sur la structure, la diversité et les fonctions des communautés, permet alors leur étude dans des conditions opératoires choisies et contrôlées. Cette stratégie efficace développée au cours de ce travail pourrait être employée dans bien d'autres domaines et sous bien d'autres conditions que celles de la digestion anaérobie et de la dégradation de micropolluants. Cet outil, mis en place sur des échantillons de boue peut par ailleurs être adapté à d'autres matrices complexes riches en EPS comme par exemple des biofilms ou granules microbiens retrouvés dans de nombreux procédés de traitement biologiques d'effluents. Ce protocole d'extraction permet aussi de comparer les communautés d'un grand nombre d'écosystèmes de structures et de caractéristiques physico-chimiques différentes sans que celles-ci n'interfèrent directement sur les communautés et les conditions opératoires choisies. Aussi, dans le cas d'écosystèmes complexes organisés en agrégat, riches en EPS, cette extraction pourrait permettre de faciliter l'emploi des protocoles expérimentaux de caractérisation des microorganismes basés sur des outils faisant par exemple intervenir la fluorescence (DAPI) ou le comptage de cellules libres (cytométrie).

Dans notre cas, cette méthodologie d'extraction appliquée à trois écosystèmes présentant des historiques de pollution contrastés nous a permis l'obtention de trois communautés microbiennes de structure et de diversité *a priori* différentes. Elles ont été utilisées comme source d'inoculum pour des réacteurs anaérobies alimentés avec une même boue stérilisée (afin de ne pas apporter une diversité microbienne supplémentaire) et enrichie en HAP, PCB et NP. Ces bioréacteurs ont donc permis, tout en suivant leur propre évolution de structure et de diversité microbienne, sous des conditions opératoires contrôlées et similaires (alimentation avec la même boue et donc

a priori avec la même disponibilité des micropolluants), d'étudier l'influence de ses trois communautés microbiennes sur :

- (i) les cinétiques d'abattement en HAP, PCB et NP au cours de la digestion,
- (ii) l'activité microbienne du système et l'expression de fonctions spécifiques impliquées dans la dégradation des micropolluants,
- (iii) la distribution des micropolluants au sein des compartiments particuliers/aqueux, et fraction dissoute et colloïdale, au regard de l'expression d'une activité toxique dans ces mêmes compartiments,
- (iv) la toxicité résiduelle du substrat après digestion.

A partir des trois écosystèmes initiaux, nous avons obtenu deux types distincts de comportement de digestion, l'un bloqué aux activités fermentaires et l'autre réalisant la méthanogenèse complète. Dans un même temps, nous avons aussi constaté une convergence des capacités d'abattement en HAP quelles que soient les voies métaboliques empruntées. L'analyse de la structure, de la diversité et l'identification des communautés microbiennes révèlent que les différences observées au niveau structurel sont très bien corrélées avec l'activité générale de l'écosystème quantifiée par l'accumulation d'AGV (métabolisme fermentaire) et la production de méthane (métabolisme méthanogène). Par contre, l'abattement des micropolluants ne peut s'expliquer par des différences structurelles de communauté microbienne ou par des différences de rendement méthanogène. Ces résultats soulignent à nouveau que la dégradation de ces composés organiques persistants présents en faible quantité dans la boue par rapport aux autres sources de carbone ne peut se faire qu'en combinaison avec la dégradation de co-substrats, soit au travers d'un co-métabolisme. Ils montrent que cette dégradation des micropolluants est imputable à une structure et une diversité microbienne non spécifique de la présence et de l'abattement des micropolluants mais spécifiques de la dégradation des co-substrats et des voies métaboliques empruntées. Ils suggèrent de plus que la dégradation des HAP n'est pas directement liée au processus de méthanogenèse mais aux étapes initiales de la digestion anaérobie de la matière organique.

Les résultats obtenus sur la dégradation des PCB et NP mériteraient d'être approfondis. Par exemple, concernant le devenir du nonylphénol dans nos systèmes, un bilan englobant aussi le devenir des composés polyéthoxylés s'avère nécessaire pour tenir compte au mieux des processus concomitants de dégradation et de synthèse du nonylphénol. En effet, en condition anaérobie, le nonylphénol peut être à la fois dégradé et produit via la présence de composés polyéthoxylés. L'abattement observé en NP est donc le résultat d'un équilibre entre la dégradation et la néo-synthèse de ce composé. La vision apportée par la seule analyse des abattements en nonylphénol peut donc se révéler biaisée.

Le processus de digestion anaérobie bloqué à différents stades (fermentaire ou méthanogène) devrait aboutir à la production de deux digestats de compositions physico-chimiques et de caractéristiques matricielles fonctionnelles différentes. Cette variabilité matricielle finale influence vraisemblablement la répartition des micropolluants au sein des compartiments matière des boues digérées puisqu'ils présentent des affinités contrastées aux matières organiques des boues en fonction de leur nature et de leur concentration.

Même s'ils restent majoritairement sorbés à la matière particulaire, l'étude de la répartition des HAP au sein de la boue révèle qu'une partie des micropolluants non dégradés est transférée dans la phase aqueuse et que ce transfert dépend du degré de digestion de la boue. Au sein du compartiment aqueux, un réarrangement s'opère également et les HAP sont plus favorablement sorbés à la matière dissoute et colloïdale dans le cas où la digestion anaérobie est la plus efficace. L'hypothèse que des modifications physico-chimiques et fonctionnelles, s'opérant sur les compartiments matière et donc dépendantes du rendement de digestion, influencent la répartition des micropolluants est par la même fortement suggérée. Une caractérisation physico-chimique et fonctionnelle de la nature des compartiments plus approfondie nous permettrait de mettre en perspective le degré de digestion et la caractérisation de ses sous-produits, avec l'affinité des micropolluants pour chaque compartiment. Dans cette perspective, de nouveaux outils de caractérisation de la matière comme la fluorescence 3D peuvent être envisagés. Cette approche employée sur les HAP pourra par ailleurs être transposée sur les PCB et NP.

Les communautés microbiennes ont exprimé des activités différentes de dégradation de la matière qui ont eu un impact sur les interactions matrice/micropolluants. La modification de ces interactions peut, en soit, introduire des différences d'expression de la toxicité des micropolluants. La mesure des activités de perturbation endocrinienne via la mesure des activités œstrogénique, androgénique, *dioxin-like* et *HAP-like* a révélé que l'activité majoritairement présente étaient celle *HAP-like*. D'un point de vue global, quelle que soit la voie métabolique empruntée, l'activité toxique globale de la boue n'est pas influencée par le processus de digestion. Cependant des différences au niveau des activités des compartiments particulaire et aqueux sont notables entre les voies fermentaires. L'étude de l'activité *HAP-like* montre que les activités mesurées dans le compartiment particulaire sont plus faibles lorsque la digestion est plus avancée et que, inversement, l'activité mesurée dans le compartiment aqueux augmente ce qui est bien corrélé au transfert de la phase particulaire à l'aqueux envisagé. Cette dynamique est inverse quand la digestion est moins efficace. La présence de métabolites induisant une activité *HAP-like* est fortement suggérée par les différences entre activité mesurée et activité théorique et par le fait que des abattements en HAP sont mesurés dans nos systèmes sans pour autant voir l'activité globale *HAP-like* diminuée. Il peut par ailleurs

s'agir de métabolites de nature différente suivant la voie fermentaire. L'identification de ces intermédiaires potentiels de dégradation des HAP et pouvant induire une activité *HAP-like* nous renseignerait sur les voies de dégradation des micropolluants en condition méthanogène que nous pourrions confronter avec celles supposées dans d'autres conditions anaérobies. La présence d'intermédiaires métaboliques démontrerait d'autre part l'implication forte des processus biologiques dans la dégradation des molécules.

L'étude de la présence de gènes potentiellement impliqués dans la dégradation des molécules mono-aromatiques (gène *bssA*) et dans la déchloration des cycles aromatiques (gène *rdh*) ne nous a pas permis de mettre en évidence des populations spécifiques responsables de ces processus. L'utilisation de ces outils pour étudier la dégradation des micropolluant en condition méthanogène se base sur des *a priori* forts quant au rôle de ces gènes dans la dégradation de ces molécules. Or, à la vue des connaissances sous condition méthanogène, il est difficile de valider cette hypothèse. L'utilisation d'outils sans *a priori* tels que des outils de métagénomique et métatranscriptomique nous permettrait peut être de mettre en évidence des gènes impliqués dans la dégradation des micropolluants organiques en condition méthanogène et *in fine* d'identifier les acteurs de cette dégradation. Par ailleurs, les études dans lesquelles ces outils sont employés portent sur des milieux hypercontaminés où la fonction de dégradation représente une activité majeure de l'écosystème et est vraisemblablement supportée par une communauté spécifique. Dans nos systèmes, la pression de sélection imposée par de faibles concentrations en micropolluants explique peut-être la difficulté d'emploi des outils utilisés. Dans des systèmes faiblement contaminés, les fonctions de dégradation des micropolluants ne sont peut-être pas portées par des populations très spécifiques (du fait de la faible pression de sélection imposée) mais plutôt par un consortium microbien qui les co-métabolise lors des phases fermentaires. D'ailleurs, en condition peu favorable à l'expression d'un co-métabolisme (comme dans nos expériences utilisant du phénanthrène marqué), la dégradation des micropolluants est difficilement observable. Pour pallier ce biais méthodologique, l'ajout d'une source de carbone facilement biodégradable est proposé. Le marquage de cette source de carbone sur un autre atome que le carbone (l'azote par exemple) permettrait de mettre en évidence, voire d'identifier les acteurs du co-métabolisme. L'analyse et l'identification de composés sous-produits marqués seraient une autre voie d'identification des voies métaboliques de dégradation.

Elucider les processus de dégradation des micropolluants sous condition anaérobie semble ne pas pouvoir se faire par une approche mono-disciplinaire. Le couplage des connaissances apportées par les analyses chimiques, écotoxicologiques et microbiologiques, développé dans cette étude devrait être encouragé et poursuivi dans

le but, dans un premier temps, d'identifier les co-substrats et les métabolites intermédiaires de dégradation et dans un deuxième temps, basé sur ces connaissances de remonter aux fonctions et pouvoir élaborer des marqueurs biologiques pertinents pour suivre les communautés dégradantes. Ce couplage des différentes approches peut par ailleurs être employé à l'étude de la dégradation d'autres molécules polluantes dans d'autre processus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aceves-Lara, C.A., Latrille, E., Buffiere, P., Bernet, N., Steyer, J.-P., 2008. Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 47 (11), 1968–1975.
- Adrian, L., Dudkova, V., Demnerova, K., Bedard, D.L., 2009. *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1 extensively dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1260. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (13), 4516–4524.
- Ahel, M., Giger, W., Molnar, E., Ibric, S., 2000. Determination of nonylphenol polyethoxylates and their lipophilic metabolites in sewage effluents by normal-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Croatica Chemica Acta* 73 (1), 209–227.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Amalfitano, S., Fazi, S., 2008. Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *Journal of Microbiological Methods* 75 (2), 237–243.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Review* 59 (1), 143–169.
- Andreadakis, A.D., 1993. Physical and chemical-properties of activated-sludge floc. *Water Research* 27 (12), 1707–1714.
- Annweiler, E., Materna, A., Safinowski, M., Kappler, A., Richnow, H.H., Michaelis, W., Meckenstock, R.U., 2000. Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (12), 5329–5333.
- Aparicio, I., Santos, J.L., Alonso, E., 2007. Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography-mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants. *Analytica Chimica Acta* 584 (2), 455–461.
- Balaguer, P., François, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, a M., Pons, M., Nicolas, J.C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *The Science of the Total Environment* 233 (1-3), 47–56.
- Barbier, G., 2011. Rapport sur les perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution, Sénat: Assemblée nationale, France.
- Barra Caracciolo, A., Grenni, P., Cupo, C., Rossetti, S., 2005. In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads. *FEMS Microbiology Letters* 253 (1), 55–58.
- Barret, M., 2009. Devenir des perturbateurs endocriniens HAP/NP/PCB au cours de la digestion anaérobie de boues contaminées: rôle de la biodisponibilité et du co-métabolisme. Thèse de l'université Montpellier 2
- Barret, M., Barcia, G.C., Guillon, A., Carrère, H., Patureau, D., 2010a. Influence of feed characteristics on the removal of micropollutants during the anaerobic digestion of contaminated sludge. *Journal of Hazardous Materials* 181 (1–3), 241–247.
- Barret, M., Carrère, H., Delgadillo, L., Patureau, D., 2010b. PAH fate during the anaerobic digestion of contaminated sludge: Do bioavailability and/or cometabolism limit their biodegradation? *Water Research* 44 (13), 3797–3806.
- Barret, M., Carrère, H., Latrille, E., Wisniewski, C., Patureau, D., 2010c. Micropollutant and sludge characterization for modeling sorption equilibria. *Environmental Science & Technology* 44 (3), 1100–1106.

Références bibliographiques

- Barret, M., Patureau, D., Latrille, E., Carrère, H., 2010. A three-compartment model for micropollutants sorption in sludge: methodological approach and insights. *Water Research* 44 (2), 616–624.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A., 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 45 (10), 65–73.
- Bedard, D.L., 2008. A Case Study for Microbial Biodegradation: Anaerobic bacterial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls—from sediment to defined medium. *Annual Review of Microbiology* 62, 253–270.
- Benabdallah El-Hadj, T., Dosta, J., Torres, R., Mata-Álvarez, J., 2007. PCB and AOX removal in mesophilic and thermophilic sewage sludge digestion. *Biochemical Engineering Journal* 36 (3), 281–287.
- Berdugo-Clavijo, C., Dong, X., Soh, J., Sensen, C.W., Gieg, L.M., 2012. Methanogenic biodegradation of two-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology* 81 (1), 124–33.
- Bertaux, J., Gloger, U., Schmid, M., Hartmann, A., Scheu, S., 2007. Routine fluorescence in situ hybridization in soil. *Journal of Microbiological Methods* 69 (3), 451–460.
- Bertin, L., Capodicasa, S., Fedi, S., Zannoni, D., Marchetti, L., Fava, F., 2011. Biotransformation of a highly chlorinated PCB mixture in an activated sludge collected from a Membrane Biological Reactor (MBR) subjected to anaerobic digestion. *Journal of Hazardous Materials* 186 (2–3), 2060–2067.
- Bertin, L., Capodicasa, S., Occulti, F., Girotti, S., Marchetti, L., Fava, F., 2007. Microbial processes associated to the decontamination and detoxification of a polluted activated sludge during its anaerobic stabilization. *Water Research* 41 (11), 2407–2416.
- Blanchard, M., Teil, M.J., Ollivon, D., Legenti, L., Chevreuil, M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewaters and sewage sludges from the Paris area (France). *Environmental Research* 95 (2), 184–197.
- Bopp, L.H., 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain. *Journal of Industrial Microbiology* 1, 23–29.
- Bowen De León, K., Ramsay, B.D., Fields, M.W., 2012. Quality-score refinement of SSU rRNA gene pyrosequencing differs across gene region for environmental samples. *Microbial Ecology* 64 (2), 499–508.
- Brack, W., Blaha, L., Giesy, John, P., Grote, M., Moerder, M., Schrader, S.T.S., Hecker, M.A.H., 2008. Polychlorinated naphthalenes and other dioxin-like compounds in Elbe river sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (3), 519–528.
- Braun, F., Gévaudan, G., Hamelin, J., Patureau, D., 2011. Development and application of an enzymatic and cell flotation treatment for the recovery of viable microbial cells from environmental matrices such as anaerobic sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (24), 8487–8493.
- Burke, M.D., Mayer, R.T., 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2 (6), 583–588.
- Cai, Q.-Y., Mo, C.-H., Wu, Q.-T., Zeng, Q.-Y., Katsoyiannis, A., 2007. Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. *Chemosphere* 68 (9), 1751–1762.

- Cea-Barcia, Glenda, E., 2012. Identification des mécanismes qui gèrent la disponibilité en vue de l'optimisation de la dégradation des micropolluants organiques au sein d'écosystèmes épuratoires, Thèse de l'université Montpellier 2.
- Cébron, A., Norini, M.-P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD[α]) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* 73 (2), 148–159.
- Céspedes, R., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barceló, D., 2008. Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain). *Environmental Pollution* 153 (2), 384–392.
- Chain, P.S.G., Denef, V.J., Konstantinidis, K.T., Vergez, L.M., Agulló, L., Reyes, V.L., Hauser, L., Córdova, M., Gómez, L., González, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J.J., Mahenthalingam, E., Malfatti, S. a, Marx, C.J., Parnell, J.J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Sul, W.J., Tsoi, T.V., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B., Tiedje, J.M., 2006. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (42), 15280–15287.
- Chang, B.-V.V., Chang, I.T., Yuan, S.Y., 2008. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80 (2), 145–149.
- Chang, B.V., Chang, S.W., Yuan, S.Y., 2003. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge. *Advances in Environmental Research* 7 (3), 623–628.
- Chang, B.V., Chiang, F., Yuan, S.Y., Chiang, B.W., 2005. Anaerobic degradation of nonylphenol in sludge. *Chemosphere* 59 (10), 1415–1420.
- Chang, B.V., Chiang, F., Yuan, S.Y., Chiang, B.W., 2007. Anaerobic degradation of nonylphenol in soil. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 42 (10), 387–392.
- Chang, B.V., Yu, C.H., Yuan, S.Y., 2004. Degradation of nonylphenol by anaerobic microorganisms from river sediment. *Chemosphere* 55 (4), 493–500.
- Chang, W., Um, Y., Holoman, T.R.P., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. *Biotechnology letters* 28 (6), 425–430.
- Chen, G., Bunce, N.J., 2004. Interaction between halogenated aromatic compounds in the Ah receptor signal transduction pathway. *Environmental Toxicology* 19 (5), 480–9.
- Christensen, N., Batstone, D.J., He, Z., Angelidaki, I., Schmidt, J.E., 2004. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from sewage sludge by anaerobic degradation. *Water Science and Technology* 50 (9), 237–244.
- Chu, C.P., Lee, D.J., 2004. Multiscale structures of biological flocs. *Chemical Engineering Science* 59 (8-9), 1875–1883.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology* 18 (1), 117–143.
- Combalbert, S., Bellet, V., Dabert, P., Bernet, N., Balaguer, P., Hernandez-Raquet, G., 2012. Fate of steroid hormones and endocrine activities in swine manure disposal and treatment facilities. *Water Research* 46 (3), 895–906.
- Corvini, P., Schäffer, A., Schlosser, D., 2006. Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols—our evolving view. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (2), 223–243.
- Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P., Simonet, P., 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environmental Microbiology* 3 (7), 431–439.

Références bibliographiques

- Cullen, D.W., Hirsch, P.R., 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry* 30 (8-9), 983–993.
- Cutter, L., Sowers, K.R., May, H.D., 1998. Microbial dechlorination of 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl under anaerobic conditions in the absence of soil or sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (8), 2966–2969.
- Cutter, L.A., Watts, J.E.M., Sowers, K.R., May, H.D., 2001. Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2,3,5,6-chlorobiphenyl. *Environmental Microbiology* 3 (11), 699–709.
- Davidova, I. a, Gieg, L.M., Duncan, K.E., Suflita, J.M., 2007. Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment. *The ISME Journal* 1 (5), 436–442.
- Delbès, C., Moletta, R., Godon, J.-J., 2001. Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 35 (1), 19–26.
- Delgadillo-Mirquez, L., Lardon, L., Steyer, J.-P., Patureau, D., 2011. A new dynamic model for bioavailability and cometabolism of micropollutants during anaerobic digestion. *Water Research* 45 (15), 4511–4521.
- Delgadillo-Mirquez, Liliana, R., 2011. Modeling the fate of micropollutant organics during anaerobic digestion of contaminated sewage sludge, Thèse de l'université Montpellier 2.
- Delmont, T.O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I.M., Constancias, F., Simonet, P., Hirsch, P.R., Vogel, T.M., 2011. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *applied and environmental microbiology* 77 (4), 1315–1324.
- Dey, E.S., Szewczyk, E., Wawrzynczyk, J., Norrflow, O., 2006. A novel approach for characterization of exopolymeric material in sewage sludge. *Journal of Residual Science & Technology* 3 (2), 97–103.
- Ding, Y.S., Ashley, D.L., Watson, C.H., 2007. Determination of 10 carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (15), 5966–5973.
- Domingo, J.L., Bocio, A., 2007. Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: a literature review. *Environment International* 33 (3), 397–405.
- Dost, K., İdeli, C., 2012. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection. *Food Chemistry* 133 (1), 193–199.
- Dreywood, R., 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 18 (8), 499–499.
- Dumont, M., Harmand, J., Rapaport, A., Godon, J.-J., 2009. Towards functional molecular fingerprints. *Environmental Microbiology* 11 (7), 1717–1727.
- Fagervold, S.K., May, H.D., Sowers, K.R., 2007. Microbial reductive dechlorination of aroclor 1260 in Baltimore harbor sediment microcosms is catalyzed by three phylotypes within the phylum *Chloroflexi*. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (9), 3009–3018.
- Fasano, E., Bono-Blay, F., Cirillo, T., Montuori, P., Lacorte, S., 2012. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging. *Food Control* 27 (1), 132–138.
- Feng, J., Zhai, M., Sun, J., Liu, Q., 2012. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediment from the upper reach of Huaihe River, East China. *Environmental Science and Pollution Research International* 19 (4), 1097–1106.

- Fennell, D.E., Nijenhuis, I., Wilson, S.F., Zinder, S.H., Haggblom, M.M., 2004. *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. *Environmental Science & Technology* 38 (7), 2075–2081.
- Gabriel, F.L.P., Heidlberger, A., Rentsch, D., Giger, W., Guenther, K., Kohler, H.-P.E., 2005. A novel metabolic pathway for degradation of 4-nonylphenol environmental contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram: ipso-hydroxylation and intramolecular rearrangement. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (16), 15526–15533.
- Ghanem, A., Bados, P., Estaun, A.R., de Alencastro, L.F., Taibi, S., Einhorn, J., Mougin, C., 2007. Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. *Chemosphere* 69 (9), 1368–1373.
- Gibson, J., S Harwood, C., 2002. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annual Review of Microbiology* 56, 345–369.
- Gihring, T.M., Green, S.J., Schadt, C.W., 2012. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environmental Microbiology* 14 (2), 285–290.
- Godon, J.-J., Morinière, J., Moletta, M., Gaillac, M., Bru, V., Delgenes, J.-P., 2005. Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: the *Synergistes* example. *Environmental Microbiology* 7 (2), 213–224.
- Godon, J.-J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R., 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit {rDNA} sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7), 2802–2813.
- González, M.M., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2010. Occurrence and risk assessment of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge from different conventional treatment processes. *The Science of the Total Environment* 408 (3), 563–570.
- Gunawardena, J., Egodawatta, P., Ayoko, G. a., Goonetilleke, A., 2012. Role of traffic in atmospheric accumulation of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmospheric Environment* 54, 502–510.
- Guo, L., Zhang, B., Xiao, K., Zhang, Q., Zheng, M., 2009. Levels and distributions of polychlorinated biphenyls in sewage sludge of urban wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Sciences* 21 (4), 468–473.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J.-P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (19), 10660–10673.
- Habouzit, F., Gévaudan, G., Hamelin, J., Steyer, J.-P., Bernet, N., 2011. Influence of support material properties on the potential selection of *Archaea* during initial adhesion of a methanogenic consortium. *Bioresource Technology* 102 (5), 4054–4060.
- Haegeman, B., Hamelin, J., Moriarty, J., Neal, P., Dushoff, J., Weitz, J.S., n.d. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *The ISME Journal* (soumission in progress).
- Hawthorne, S.B., Grabanski, C.B., Miller, D.J., Kreitinger, J.P., 2005. Solid-phase microextraction measurement of parent and alkyl polycyclic aromatic hydrocarbons in milliliter sediment pore water samples and determination of K(DOC) values. *Environmental Science & Technology* 39 (8), 2795–2803.
- Hernandez-Raquet, G., Soef, A., Delgenès, N., Balaguer, P., 2007. Removal of the endocrine disrupter nonylphenol and its estrogenic activity in sludge treatment processes. *Water Research* 41 (12), 2643–2651.

Références bibliographiques

- Hethener, P., Brauman, A., Garcia, J.-L., 1992. *Clostridium termitidis* sp. nov., a Cellulolytic bacterium from the gut of the wood-feeding termite, *Nasutitermes lujae*. Systematic and Applied Microbiology 15 (1), 52–58.
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., Tiedje, J.M., 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. Applied and environmental microbiology 54 (3), 703–711.
- Houessou, J.K., Goujot, D., Heyd, B., Camel, V., 2008. Modeling the formation of some polycyclic aromatic hydrocarbons during the roasting of Arabica coffee samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (10), 3648–3656.
- Höhne, C., Püttmann, W., 2008. Occurrence and temporal variations of the xenoestrogens bisphenol A, 4-tert-octylphenol, and tech. 4-nonylphenol in two German wastewater treatment plants. Environmental Science and Pollution Research International 15 (5), 405–416.
- INERIS, 2005. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France _ Nonylphenols et ethoxylates.
- INERIS, 2011. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Les polyChloroBiphenyles (PCB).
- Jindrová, E., Chocová, M., Demnerová, K., Brenner, V., 2002. Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene. Folia Microbiologica 47 (2), 83–93.
- Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G., Urbain, V., Manem, J., 1995. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated-sludge flocs. Water Research 29 (7), 1639–1647.
- Ju, J.-H., Lee, I.-S., Sim, W.-J., Eun, H., Oh, J.-E., 2009. Analysis and evaluation of chlorinated persistent organic compounds and PAHs in sludge in Korea. Chemosphere 74 (3), 441–447.
- Katsoyiannis, A., Samara, C., 2004. Persistent organic pollutants (POPs) in the sewage treatment plant of Thessaloniki, northern Greece: occurrence and removal. Water Research 38 (11), 2685–2698.
- Keppler, F., Laukenmann, S., Rinne, J., Heuwinkel, H., Greule, M., Whiticar, M., Lelieveld, J., 2010. Measurements of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ methane from anaerobic digesters: comparison of optical spectrometry with continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. Environmental Science & Technology 44 (13), 5067–5073.
- Khadhar, S., Higashi, T., Hamdi, H., Matsuyama, S., Charef, a, 2010. Distribution of 16 EPA-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sludges collected from nine Tunisian wastewater treatment plants. Journal of Hazardous Materials 183 (1-3), 98–102.
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2010. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987) 158 (1), 74–83.
- Kjellerup, B.V., Sun, X.L., Ghosh, U., May, H.D., Sowers, K.R., 2008. Site-specific microbial communities in three PCB-impacted sediments are associated with different in situ dechlorinating activities. Environmental Microbiology 10 (5), 1296–1309.
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., Schmidt, T.M., 2001. rrndb: the Ribosomal {RNA} Operon Copy Number Database. Nucleic Acids Research 29 (1), 181–184.
- Kohler, Hans-Peter, E., Gabriel, Frédéric, L, P., Giger, W., 2008. ipso-Substitution - A novel pathway for microbial metabolism of endocrine-disrupting 4-nonylphenols, 4-alkoxyphenols, and bisphenol A. Chimia 62 (5), 358–363.

- Krumins, V., Park, J.-W., Son, E.-K., Rodenburg, L.A., Kerkhof, L.J., Häggblom, M.M., Fennell, D.E., 2009. PCB dechlorination enhancement in Anacostia River sediment microcosms. *Water Research* 43 (18), 4549–4558.
- Kube, M., Beck, A., Zinder, S.H., Kuhl, H., Reinhardt, R., Adrian, L., 2005. Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nature Biotechnology* 23 (10), 1269–1273.
- Kuntze, K., Shinoda, Y., Moutakki, H., McInerney, M.J., Vogt, C., Richnow, H.-H., Boll, M., 2008. 6-Oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-coenzyme A hydrolases from obligately anaerobic bacteria: characterization and identification of its gene as a functional marker for aromatic compounds degrading anaerobes. *Environmental Microbiology* 10 (6), 1547–1556.
- Lee, D., Zo, Y., Kim, S.-J., 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR – Single-Strand-Conformation Polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (9), 3112–3120.
- Li, T., Wu, T.-D., Mazéas, L., Toffin, L., Guerquin-Kern, J.-L., Leblon, G., Bouchez, T., 2008. Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. *Environmental Microbiology* 10 (3), 580–588.
- Li, Y.-N., Porter, a W., Mumford, A., Zhao, X.-H., Young, L.Y., 2012. Bacterial community structure and bamA gene diversity in anaerobic degradation of toluene and benzoate under denitrifying conditions. *Journal of Applied Microbiology* 112 (2), 269–279.
- Lindahl, V., 1996. Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival. *Journal of Microbiological Methods* 25 (3), 279–286.
- Lindahl, V., Aa, K., Olsen, R.A., 1996. Effects on microbial activity by extraction of indigenous cells from soil slurries. *FEMS Microbiology Ecology* 21 (3), 221–230.
- Lindahl, V., Bakken, L.R., 1995. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiology Ecology* 16 (2), 135–142.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.-E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.M., Ben-Hassine, O.K., Aït-Aïssa, S., 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *The Science of the Total Environment* 402 (2-3), 318–29.
- Lowry, O., H., Rosebrough, N., J., Farr, A., L., Randall, R., J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–271.
- Lu, X.-Y., Li, B., Zhang, T., Fang, H.H.-P., 2012. Enhanced anoxic bioremediation of PAHs-contaminated sediment. *Bioresource Technology* 104, 51–58.
- Lu, X.-Y., Zhang, T., Fang, H.H.-P., 2011. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (5), 1357–1371.
- Madden, R.H., Bryder, M.J., Poole, N.J., 1982. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium papyrosolvans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32 (1), 87–91.
- Mansuy-Huault, L., Regier, A., Faure, P., 2009. Analyzing hydrocarbons in sewer to help in PAH source apportionment in sewage sludges. *Chemosphere* 75 (8), 995–1002.
- Mao, Z., Zheng, X.-F., Zhang, Y.-Q., Tao, X.-X., Li, Y., Wang, W., 2012. Occurrence and biodegradation of nonylphenol in the environment. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (1), 491–505.

Références bibliographiques

- Maron, P.A., Schimann, H., Ranjard, L., Brothier, E., Domenach, A.M., Lensi, R., Nazaret, S., 2006. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *European Journal of Soil Biology* 42 (2), 65–73.
- May, H.D., Cutter, L.A., Miller, G.S., Milliken, C.E., Watts, J.E.M., Sowers, K.R., 2006. Stimulatory and inhibitory effects of organohalides on the dehalogenating activities of PCB-dechlorinating bacterium o-17. *Environmental Science & Technology* 40 (18), 5704–5709.
- May, H.D., Miller, G.S., Kjellerup, B.V., Sowers, K.R., 2008. Dehalorespiration with polychlorinated biphenyls by an anaerobic ultramicrobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (7), 2089–2094.
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B., Costerton, J.W., 1981. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., anaerobic syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 41 (4), 1029–1039.
- McInerney, M.J., Struchtemeyer, C.G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A.J.M., Schink, B., Rohlin, L., Gunsalus, R.P., 2008. Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 58–72.
- McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W.L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A.L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R.D., Yang, G., Stott, J.M., Schein, J.E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A.S., Marra, M. a, Jones, S.J.M., Holt, R., Brinkman, F.S.L., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J.E., Mohn, W.W., Eltis, L.D., 2006. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (42), 15582–15587.
- Meckenstock, R.U., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H.H., Schink, B., 2000. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7), 2743–2747.
- Meckenstock, R.U., Mouttaki, H., 2011. Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 22 (3), 406–414.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., 2009. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 9 (5), 1359–1363.
- Mirza, R., Mohammadi, M., Dadolahi Sohrab, A., Safahieh, A., Savari, A., Hajeb, P., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater, sediment, and rock oyster *Saccostrea cucullata* from the northern part of the Persian Gulf (Bushehr Province). *Water, Air, & Soil Pollution* 223 (1), 189–198.
- Moletta-Denat, M., Bru-Adan, V., Delgenes, J.-P., Hamelin, J., Wéry, N., Godon, J.-J., 2010. Selective microbial aerosolization in biogas demonstrated by quantitative PCR. *Bioresource Technology* 101 (19), 7252–7257.
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., Carrère, H., 2011. Lignocellulosic materials into Biohydrogen and Biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (article accepted).
- MuToss coding Team, Blanchard, G., Dickhaus, T., Hack, N., Konietshke, F., Rohmeyer, K., Rosenblatt, J., Scheer, M., Werf, W., 2010. mutoss: unified mutiple testing procedures.
- Muller, M., Combalbert, S., Delgenès, N., Bergheaud, V., Rocher, V., Benoît, P., Delgenès, J.-P., Patureau, D., Hernandez-Raquet, G., 2010. Occurrence of estrogens in sewage sludge and their fate during plant-scale anaerobic digestion. *Chemosphere* 81 (1), 65–71.
- Muncke, J., 2009. Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? *The Science of the Total Environment* 407 (16), 4549–4559.

- Musat, F., Galushko, A., Jacob, J., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Wilkes, H., Schink, B., Rabus, R., 2009. Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology* 11 (1), 209–219.
- Muyzer, G., De Waal, Ellen, C., Uitterlinden, André, G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (3), 695–700.
- Naccari, C., Cristani, M., Giofrè, F., Ferrante, M., Siracusa, L., Trombetta, D., 2011. PAHs concentration in heat-treated milk samples. *Food Research International* 44 (3), 716–724.
- Nakada, N., Yasojima, M., Okayasu, Y., Komori, K., Tanaka, H., Suzuki, Y., 2006. Fate of oestrogenic compounds and identification of oestrogenicity in a wastewater treatment process. *Water Science & Technology* 53 (11), 51–63.
- Nelson, M.C., Morrison, M., Yu, Z., 2011. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology* 102 (4), 3730–9.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschufer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., Klocke, M., 2010. Polyphasic Analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (8), 2540–2548.
- Nielsen, P.H., Thomsen, T.R., Nielsen, J.L., 2004. Bacterial composition of activated sludge - importance for floc and sludge properties. *Water Science and Technology* 49 (10), 51–58.
- Nosyk, O., Haseborg, E., Metzger, U., Frimmel, F.H., 2008. A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization. *Journal of Microbiological Methods* 75 (3), 449–456.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2010. *Vegan : Community Ecology Package*.
- Palmer, P.M., Wilson, L.R., Casey, A.C., Wagner, R.E., 2011. Occurrence of PCBs in raw and finished drinking water at seven public water systems along the Hudson River. *Environmental Monitoring and Assessment* 175 (1-4), 487–499.
- Park, J.-W., Krumins, V., Kjellerup, B.V., Fennell, D.E., Rodenburg, L.A., Sowers, K.R., Kerkhof, L.J., Häggblom, M.M., 2011. The effect of co-substrate activation on indigenous and bioaugmented PCB dechlorinating bacterial communities in sediment microcosms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (6), 2005–2017.
- Paterakis, N., Chiu, T.Y., Koh, Y.K.K., Lester, J.N., McAdam, E.J., Scrimshaw, M.D., Soares, a, Cartmell, E., 2012. The effectiveness of anaerobic digestion in removing estrogens and nonylphenol ethoxylates. *Journal of Hazardous Materials* 199-200, 88–95.
- Patureau, D., Delgenes, N., Delgenes, J.-P., 2008a. Impact of sewage sludge treatment processes on the removal of the endocrine disruptors nonylphenol ethoxylates. *Chemosphere* 72 (4), 586–591.
- Patureau, D., Hernandez-Raquet, G., Balaguer, P., Delgenes, N., Muller, M., Dagnino, S., Delgenes, J.-P., 2008b. Relevant approach to assess performances of wastewater biosolids composting in terms of micropollutants removal. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 58 (1), 45–52.
- Patureau, D., Trably, E., 2006. Impact of anaerobic and aerobic processes on PolyChloroBiphenyl removal in contaminated sewage sludge. *Biodegradation* 17 (1), 9–17.
- Pieper, D.H., Seeger, M., 2008. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15 (2-3), 121–138.
- Quemeneur, M., Hamelin, J., Benomar, S., Guidici-Ortoni, M.-T., Latrille, E., Steyer, J.-P., Trably, E., 2011. Changes in hydrogenase genetic diversity and proteomic patterns in mixed-culture

- dark fermentation of mono-, di- and tri-saccharides. *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (18), 11654–11665.
- R. Development Core Team, 2010. R: a language and environment for statistical computing.
- Ramette, A., 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62 (2), 142–160.
- Ravindra, K., Sokhi, R., Vangrieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* 42 (13), 2895–2921.
- Rey-Salgueiro, L., García-Falcón, M.S., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., 2008. Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chemistry* 108 (2), 607–615.
- Rockne, K.J., Chee-sanford, J.C., Sanford, R.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T., Strand, S.E., 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4), 1595–1601.
- Rockne, K.J., Strand, S.E., 2001. Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Water Research* 35 (1), 291–299.
- Roig, N., Sierra, J., Nadal, M., Martí, E., Navalón-Madrigal, P., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2012. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. *The Science of the Total Environment* 425, 99–109.
- Ryan, J.A., Hightower, L.E., 1994. Evaluation of heavy-metal ion toxicity in fish cells using a combined stress protein and cytotoxicity assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13 (8), 1231–1240.
- Saikaly, P.E., Stroot, P.G., Oerther, D.B., 2005. Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (10), 5814–5822.
- Salapavidou, M., Samara, C., Voutsas, D., 2011. Endocrine disrupting compounds in the atmosphere of the urban area of Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment* 45 (22), 3720–3729.
- Schnurer, A., Schink, B., Svensson, B.H., 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (4), 1145–1152.
- Sen, B., Hamelin, J., Bru-Adan, V., Godon, J.-J., Chandra, T.S., 2008. Structural divergence of bacterial communities from functionally similar laboratory-scale vermicomposts assessed by PCR-CE-SSCP. *Journal of Applied Microbiology* 105 (6), 2123–2132.
- Seshadri, R., Adrian, L., Fouts, D.E., Eisen, J. a, Phillippy, A.M., Methe, B. A., Ward, N.L., Nelson, W.C., Deboy, R.T., Khouri, H.M., Kolonay, J.F., Dodson, R.J., Daugherty, S.C., Brinkac, L.M., Sullivan, S. a, Madupu, R., Nelson, K.E., Kang, K.H., Impraim, M., Tran, K., Robinson, J.M., Forberger, H. a, Fraser, C.M., Zinder, S.H., Heidelberg, J.F., 2005. Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science* 307 (5706), 105–108.
- Shin, S.G., Lee, S., Lee, C., Hwang, K., Hwang, S., 2010. Qualitative and quantitative assessment of microbial community in batch anaerobic digestion of secondary sludge. *Bioresource Technology* 101 (24), 9461–9470.
- Simon, S., Pairo, B., Villain, M., D'Abzac, P., Hullebusch, E.V., Lens, P., Guibaud, G., 2009. Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Bioresource Technology* 100 (24), 6258–6268.
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163 (4148), 688.

- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., Tebbe, C.C., 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* 69 (3), 470–479.
- Smidt, H., de Vos, W.M., 2004. Anaerobic microbial Dehalogenation. *Annual Review of Microbiology* 58 (1), 43–73.
- Snell-Castro, R., Godon, J.-J., Delgenès, J.-P., Dabert, P., 2005. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 52 (2), 229–242.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34 (7), 1033–1049.
- de Souza Pereira, M., Kuch, B., 2005. Heavy metals, PCDD/F and PCB in sewage sludge samples from two wastewater treatment facilities in Rio de Janeiro State, Brazil. *Chemosphere* 60 (7), 844–53.
- Srogi, K., 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters* 5 (4), 169–195.
- Sukhumavas, J., Ohmiya, K., Shimizu, S., Uen, K., 1988. Species from thai compost 179–182.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F., Massé, D.I., 2008. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research* 42 (3), 513–537.
- Tarnawski, S., Hamelin, J., Jossi, M., Aragno, M., Fromin, N., 2006. Phenotypic structure of *Pseudomonas* populations is altered under elevated pCO₂ in the rhizosphere of perennial grasses. *Soil Biology and Biochemistry* 38 (6), 1193–1201.
- Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R., 2012. Multivariate analysis of mixed contaminants (PAHs and heavy metals) at manufactured gas plant site soils. *Environmental Monitoring and Assessment* 184 (6), 3875–3885.
- Thiele, J.H., 1991. Mixed-culture interactions in methanogenesis. In: *Mixed Cultures in Biotechnology*.
- Tian, W., Bai, J., Liu, K., Sun, H., Zhao, Y., 2012. Occurrence and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in the wastewater treatment process. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 82, 1–7.
- Trably, E., Delgenes, N., Patureau, D., Delgenes, J.P., 2004. Statistical tools for the optimization of a highly reproducible method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 84 (13), 995–1008.
- Trably, E., Lackner, S., Batstone, D.J., Patureau, D., Schmidt, J.E., 2005. Identification of Nonyl-Phenol degraders in anaerobic enrichment of waste activated sludge. In: *IWA Brisbane, gold coast Australia, 17-20 july (Ed.), 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference - Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment*.
- Trably, E., Patureau, D., 2006. Successful treatment of low PAH-contaminated sewage sludge in aerobic bioreactors. *Environmental Science and Pollution Research International* 13 (3), 170–176.
- Trably, E., Patureau, D., Delgenes, J.P., 2003. Enhancement of polycyclic aromatic hydrocarbons removal during anaerobic treatment of urban sludge. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 48 (4), 53–60.

Références bibliographiques

- Tsai, J.-C., Kumar, M., Lin, J.-G., 2009. Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. *Journal of Hazardous Materials* 164 (2-3), 847–855.
- Tuan, N.N., Hsieh, H.-C., Lin, Y.-W., Huang, S.-L., 2011. Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresource Technology* 102 (5), 4232–4240.
- Turgut, C., Atatanir, L., Mazmanci, B.B., Mazmanci, M.A., Henkelmann, B., Schramm, K.-W., 2012. The occurrence and environmental effect of persistent organic pollutants (POPs) in Taurus Mountains soils. *Environmental Science and Pollution Research International* 19 (2), 325–334.
- Villar, P., Villar, M., Callejon, M., Prez, J. L., Jeminez, J.C., Alonso, E., Guiraum, A., 2009. Evolution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals in sludge samples from conventional activated sludge wastewater treatment plants. *Environmetrics* 20, 561–574.
- Vindimian, E., Robaut, C., Fillon, G., 1983. A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. *Journal of Applied Biochemistry* 5 (4-5), 261–268.
- Vogt, C., Kleinstauber, S., Richnow, H.-H., 2011. Anaerobic benzene degradation by bacteria. *Microbial Biotechnology* 4 (6), 710–724.
- Washer, C.E., Edwards, E.A., 2007. Identification and expression of benzylsuccinate synthase genes in a toluene-degrading methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (4), 1367–1369.
- Wawrzynczyk, J., Recktenwald, M., Norrlöw, O., Dey, E.S., 2008. The function of cation-binding agents in the enzymatic treatment of municipal sludge. *Water Research* 42 (6-7), 1555–1562.
- Wawrzynczyk, J., Szewczyk, E., Norrlöw, O., Dey, E., 2007. Application of enzymes, sodium tripolyphosphate and cation exchange resin for the release of extracellular polymeric substances from sewage sludge characterization of the extracted polysaccharides/glycoconjugates by a panel of lectins. *Journal of Biotechnology* 130 (3), 274–281.
- Weelink, S. a. B., Eekert, M.H. a., Stams, A.J.M., 2010. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 9 (4), 359–385.
- De Weert, J.P. a, Viñas, M., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H.H.M., Langenhoff, A. a M., 2011. Degradation of 4-n-nonylphenol under nitrate reducing conditions. *Biodegradation* 22 (1), 175–187.
- Werner, J.J., Knights, D., Garcia, M.L., Scalfone, N.B., Smith, S., Yarasheski, K., Cummings, T. a, Beers, A.R., Knight, R., Angenent, L.T., 2011. Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (10), 4158–4163.
- Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R., Gray, L.E., 2002. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology* 66 (1), 69–81.
- Winderl, C., Schaefer, S., Lueders, T., 2007. Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environmental Microbiology* 9 (4), 1035–1046.
- Wu, Q., Sowers, K.R., May, H.D., 2000. Establishment of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium , specific for doubly flanked chlorines , in a defined , sediment-free medium. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (1), 49–53.

- Wu, Q., Watts, J.E.M., Sowers, K.R., May, H.D., 2002a. Identification of a bacterium that Specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2), 807–812.
- Wu, Q.Z., Milliken, C.E., Meier, G.P., Watts, J.E.M., Sowers, K.R., May, H.D., 2002b. Dechlorination of chlorobenzenes by a culture containing bacterium DF-1, a PCB dechlorinating microorganism. *Environmental Science & Technology* 36 (15), 3290–3294.
- Ye, D., Quensen III, J.F., Tiedje, J.M., Boyd, S.A., 1999. 2-bromoethanesulfonate, sulfate, molybdate, and ethanesulfonate inhibit anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls by pasteurized microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1), 327–329.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (6), 670–679.
- Zanaroli, G., Balloi, A., Negroni, A., Borruso, L., Daffonchio, D., Fava, F., 2012. A *Chloroflexi* bacterium dechlorinates polychlorinated biphenyls in marine sediments under in situ-like biogeochemical conditions. *Journal of Hazardous Materials* 209-210, 449–457.
- Zeng, X., Lin, Z., Gui, H., Shao, W., Sheng, G., Fu, J., Yu, Z., 2010. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic carbons in sludges from wastewater treatment plants in Guangdong, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 169 (1-4), 89–100.
- Zhai, J., Tian, W., Liu, K., 2011. Quantitative assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants in Qingdao, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 180 (1-4), 303–311.
- Zhang, C., Liu, X., Dong, X., 2004. *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (3), 969–973.
- Zhang, S., Wang, Q., Xie, S., 2012. Stable isotope probing identifies anthracene degraders under methanogenic conditions. *Biodegradation* 23 (2), 221–230.
- Zhang, X.M., Sullivan, E.R., Young, L.Y., 2000. Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulfate reducing consortium. *Biodegradation* 11 (2-3), 117–124.
- Zumstein, E., Moletta, R., Godon, J.-J., 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* 2 (1), 69–78.

ANNEXES

Annexe 1: Proportions, dans les différents réacteurs à l'état d'équilibre, des espèces discriminantes obtenues grâce à l'ACP sur les données de pyroséquençage

Les espèces discriminantes sont représentées en gras, les Archées archées sont surlignées en gris, les p-value et r² sont obtenus par l'ACP

220

Règne	Phylum	Espèce	r ²	p-value	DSol 1	DSol 2	DSol 3	DSed 1	DSed 2	DSed 3	DBoue 1	DBoue 2	DBoue 3
Bacteria	Firmicutes	Clostridium papyrosolvans	0,997	0,001	58,4	47,9	45,5	49,3	6,3	0,4	0,1	0,1	0,1
Bacteria	Firmicutes	<i>Ruminococcus flavifaciens</i>	0,991	0,001	0,6	0,5	0,4	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria	Bacteroidetes	Parabacteroides distasonis	0,985	0,001	0,1	0,2	7,6	0,4	39,8	33,2	7,1	14,3	8,5
Bacteria	Bacteroidetes	Parabacteroides merdae	0,979	0,001	0,8	1,1	3,3	0,9	7,6	5,7	1,3	2,4	1,6
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacterium Beijerinckense	0,959	0,001						0,3	0,6	0,6	0,7
Bacteria	Bacteroidetes	Dysgonomonas mossii	0,921	0,001	1,7	1,8	12,2	4,9	20,6	15,5	7,3	7,3	7,0
Bacteria	Synergistetes	Anaerobaculum mobile	0,912	0,001	0,0	1,6	1,8	2,0	2,5	5,2	11,2	7,2	8,0
Bacteria	Firmicutes	Clostridium josui	0,867	0,001	2,4	1,2	1,2	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria	Firmicutes	<i>Anaerospira hongkongensis</i>	0,513	0,001					0,1				
Bacteria	Bacteroidetes	<i>Persicobacter diffuens</i>	0,513	0,001					0,0				
Bacteria	Firmicutes	<i>Selenomonas noxia</i>	0,513	0,001					0,0				
Bacteria	Firmicutes	<i>Paenibacillus zanthoxylum</i>	0,513	0,001					0,0				
Bacteria	Dictyoglomi	<i>Dictyoglomus turgidum</i>	0,945	0,002						0,1	1,2	1,3	1,2
Bacteria	Firmicutes	Clostridium ultunense	0,930	0,002	0,3	0,2	2,4	0,4	8,9	7,0	20,5	25,2	23,8
Bacteria	op9		0,922	0,002						0,4	3,8	3,5	2,6
Bacteria	Synergistetes	Anaerobaculum thermoterrum	0,915	0,002		0,1				0,4	1,0	0,7	1,3
Bacteria	Firmicutes	<i>Carboxydotherrmus siderophilus</i>	0,910	0,002						0,1	0,0	0,0	0,0
Bacteria	Proteobacteria	Pseudomonas stutzeri	0,929	0,003	0,0			0,0	0,1	0,2	2,9	1,8	2,7
Bacteria	Bacteroidetes	<i>Dysgonomonas gadei</i>	0,876	0,003	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria	Planctomycetes	<i>Blastopirellula marina</i>	0,828	0,003						0,2	0,6	0,5	1,1
Archaea		Archaeoglobus ferrolobus placidus	0,887	0,005						0,1	0,2	0,1	0,2
Bacteria	Firmicutes	<i>Desulfotomaculum sulfataricum</i>	0,939	0,006						0,1	0,1	0,1	0,1
Bacteria	Firmicutes	<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i>	0,912	0,006						0,0	0,0	0,0	0,0
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacterium oryzae	0,851	0,006		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	0,4
Bacteria	Firmicutes	<i>Pelotomaculum</i> spp.	0,760	0,006							0,1	0,0	0,0
Bacteria	Firmicutes	<i>Eubacterium sulci</i>	0,848	0,008					0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
Bacteria	Bacteroidetes	<i>Sediminicola</i> spp.	0,814	0,009					0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria		spam	0,695	0,009							0,2	0,1	0,1
Bacteria	Proteobacteria	<i>Nitrosococcus oceanii</i>	0,837	0,01							0,1	0,1	0,1
Bacteria	op1		0,834	0,01							1,1	2,1	1,8
Bacteria	Firmicutes	<i>Desulfosporosinus meridiei</i>	0,722	0,01			0,1		0,1	0,0	0,4	0,5	1,0
Bacteria	Firmicutes	<i>Clostridium straminisolvans</i>	0,822	0,011					0,2	0,2	0,5	0,3	0,2

Annexe 2: Activités toxiques en BaP-Eq calculées par rapport aux concentrations en HAP

Composés	Facteur d'induction équivalent BaP	Concentration en HAP dans la boue totale en µg/L									Activités toxiques calculées dans la boue totale en µg/L											
		Dsol.1	Dsol.2	Dsol.3	Dsed.1	Dsed.2	Dsed.3	DBoue 1	DBoue 2	DBoue 3	Alim	Dsol.1	Dsol.2	Dsol.3	Dsed.1	Dsed.2	Dsed.3	DBoue 1	DBoue 2	DBoue 3	Alim	
Fluorène	1,44E-02	12,3	n.a	14,1	7,8	8,8	10,9	10,3	n.a	10,3	24,8	0,2	n.a	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	n.a	0,1	0,4	0,4
Phénanthrène	0,00E+00	69,7	n.a	71,5	55,5	66,0	67,0	65,2	n.a	59,0	115,6	0,0	n.a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	n.a	0,0	0,0	0,0
Anthracène	0,00E+00	37,7	n.a	35,2	28,7	32,8	33,5	31,1	n.a	31,5	58,4	0,0	n.a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	n.a	0,0	0,0	0,0
Fluoranthène	0,00E+00	98,6	n.a	102,2	97,8	97,8	91,2	91,0	n.a	93,4	129,4	0,0	n.a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	n.a	0,0	0,0	0,0
Pyrène	3,58E-03	91,1	n.a	87,9	70,8	75,1	74,4	71,1	n.a	69,5	107,3	0,3	n.a	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	n.a	0,2	0,4	0,4
B(a)A	2,28E-01	73,2	n.a	69,9	60,2	62,3	58,6	59,9	n.a	59,7	80,4	16,7	n.a	15,9	13,7	14,2	13,4	13,7	n.a	13,6	18,3	18,3
Chrysène	2,92E-01	103,5	n.a	96,3	89,2	94,6	89,1	85,3	n.a	84,6	116,2	30,2	n.a	28,1	26,0	27,6	26,0	24,9	n.a	24,7	33,9	33,9
B(b)F	6,94E-01	90,2	n.a	86,8	80,3	86,0	80,9	77,9	n.a	77,0	98,6	62,6	n.a	60,3	55,7	59,7	56,2	54,0	n.a	53,5	66,4	66,4
B(k)F	2,94E+00	79,7	n.a	82,6	74,8	81,1	78,0	75,7	n.a	75,2	93,0	234,4	n.a	242,9	219,9	238,6	229,4	222,5	n.a	221,1	273,4	273,4
B(a)P	1,00E+00	63,0	n.a	58,2	51,9	58,7	58,4	69,0	n.a	55,5	68,5	63,0	n.a	58,2	51,9	58,7	58,4	69,0	n.a	55,5	68,5	68,5
DBA	3,66E+00	92,3	n.a	112,3	107,3	115,1	112,2	108,1	n.a	106,2	125,0	337,9	n.a	411,0	392,9	421,4	410,5	395,6	n.a	388,6	457,4	457,4
B(g,h,i)P	0,00E+00	76,1	n.a	73,9	69,7	75,5	74,2	71,8	n.a	70,2	84,3	0,0	n.a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	n.a	0,0	0,0	0,0
Indéno	8,43E-01	30,2	n.a	36,4	31,4	37,5	35,7	34,2	n.a	32,7	40,9	25,5	n.a	30,7	26,4	31,6	30,1	28,9	n.a	27,6	34,5	34,5
Total		917,8	n.a	927,4	825,5	891,4	864,0	850,5	n.a	825,0	1142,4	770,8	n.a	847,7	787,0	852,2	824,4	809,0	n.a	785,0	955,2	955,2
Composés	Facteur d'induction équivalent BaP	Concentration en HAP dans le compartiment particulaire en µg/L									Activités toxiques calculées dans le compartiment particulaire en µg/L											
Fluorène	1,44E-02	18,0	17,0	18,2	15,8	16,6	16,8	13,8	14,7	13,9	33,7	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5
Phénanthrène	0,00E+00	85,5	79,1	84,9	74,0	80,2	76,3	65,4	66,7	63,9	129,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Anthracène	0,00E+00	42,8	42,3	41,0	37,6	39,5	34,5	28,1	29,5	27,6	54,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fluoranthène	0,00E+00	107,8	104,1	108,7	89,4	94,6	89,6	75,6	79,9	71,3	130,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pyrène	3,58E-03	92,9	87,5	90,0	73,6	78,0	72,8	62,9	65,2	61,5	111,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4
B(a)A	2,28E-01	73,4	65,7	74,5	60,5	64,1	59,1	51,4	53,5	49,9	80,9	16,7	15,0	17,0	13,8	14,6	13,5	11,7	12,2	11,4	18,5	18,5
Chrysène	2,92E-01	102,5	92,4	91,7	86,9	93,9	86,3	73,7	77,1	74,9	117,8	29,9	27,0	26,8	25,4	27,4	25,2	21,5	22,5	21,9	34,4	34,4
B(b)F	6,94E-01	88,3	85,1	85,7	76,4	84,8	79,0	66,7	70,6	67,5	98,0	61,3	59,1	59,5	53,0	58,9	54,9	46,3	49,0	46,9	68,0	68,0
B(k)F	2,94E+00	78,6	77,3	78,9	73,0	77,2	73,7	65,1	66,5	63,2	91,5	231,1	227,4	231,9	214,7	226,9	216,6	191,3	195,6	185,8	269,1	269,1
B(a)P	1,00E+00	60,8	60,1	60,3	52,4	55,7	50,5	49,8	44,2	44,2	64,2	60,8	60,1	60,3	52,4	55,7	50,5	49,8	44,2	44,2	64,2	64,2
DBA	3,66E+00	113,0	109,2	110,9	104,2	113,2	105,6	92,4	90,8	89,8	124,5	413,5	399,6	406,0	381,3	414,2	386,3	338,3	332,4	328,7	455,5	455,5
B(g,h,i)P	0,00E+00	76,6	73,7	74,9	68,6	73,1	69,1	60,7	61,0	59,2	84,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Indéno	8,43E-01	36,7	35,9	36,6	32,2	36,7	34,2	30,2	24,7	29,0	40,2	30,9	30,2	30,8	27,2	31,0	28,8	25,4	20,8	24,5	33,9	33,9
Total		976,9	929,3	956,2	844,8	907,6	847,3	741,5	750,0	715,9	1160,7	844,9	818,8	832,8	768,3	829,2	776,2	690,4	682,8	663,6	944,4	944,4
Composés	Facteur d'induction équivalent BaP	Concentration en HAP dans le compartiment aqueux en µg/L									Activités toxiques calculées dans le compartiment particulaire en µg/L											
Fluorène	1,44E-02	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,5	0,5	0,7	0,6	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Phénanthrène	0,00E+00	0,5	0,5	0,7	0,5	0,9	0,8	1,1	1,4	1,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Anthracène	0,00E+00	0,4	0,4	0,5	0,4	0,8	0,7	0,9	1,2	0,9	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fluoranthène	0,00E+00	0,6	0,5	0,8	0,6	1,1	0,9	1,4	1,6	1,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pyrène	3,58E-03	0,4	0,4	0,6	0,4	0,8	0,7	1,0	1,2	1,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
B(a)A	2,28E-01	0,3	0,2	0,4	0,3	0,8	0,5	0,9	0,9	0,7	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Chrysène	2,92E-01	0,5	0,4	0,7	0,6	1,4	0,9	1,4	1,4	1,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
B(b)F	6,94E-01	0,2	0,2	0,3	0,4	0,7	0,5	1,0	0,8	0,6	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,5	0,3	0,7	0,6	0,4	0,0	0,0
B(k)F	2,94E+00	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	0,6	0,5	1,1	0,7	0,1	0,7	0,8	1,3	1,4	3,0	1,7	1,6	3,1	2,1	0,2	0,2
B(a)P	1,00E+00	0,3	0,3	0,3	0,3	1,1	0,5	1,1	0,9	0,9	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	1,1	0,5	1,1	0,9	0,9	0,0	0,0
DBA	3,66E+00	0,2	0,2	0,5	0,5	1,4	0,9	1,6	0,9	0,9	0,1	0,9	0,8	1,8	1,9	5,2	3,2	5,9	3,5	3,3	0,2	0,2
B(g,h,i)P	0,00E+00	0,1	0,1	0,2	0,3	0,8	0,4	0,9	0,5	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Indéno	8,43E-01	0,1	0,1	0,2	0,2	0,5	0,2	0,4	0,2	0,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
Total		4,4	3,9	6,0	5,4	11,6	8,0	12,8	12,8	10,6	1,9	2,3	2,2	4,0	4,3	10,8	6,2	10,3	8,8	7,6	0,5	0,5



Abstract

Due to anthropogenic activity the sludge of wastewater treatment plants are contaminated by organic micropollutants like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), polychlorinated biphenyls and nonylphenol. This study focuses on the influence of microbial communities on the fate of these three micropollutants families during the anaerobic digestion process. A specific protocol was developed to extract microorganisms from their native ecosystem while maintaining their structural and functional singularity. Three communities, with different pollution history, were thus extracted and subjected to the same selection pressure (availability of substrate and micropollutants) in continuous anaerobic digesters. These three ecosystems can be perfectly identified through the characteristics of their microbial communities and their global metabolism. However, our results show also that the degradation of micropollutants converged in these 3 systems, demonstrating the absence of link between methanogenesis and micropollutants degradation and of specialization of the microbial communities toward this degradation. In addition, the distribution of micropollutants in sludge is influenced by the metabolic pathways of those communities. The more the digestion is advanced, the greater the micropollutants are abundant in the aqueous compartment and adsorbed to the dissolved and colloidal matter. Specific functions for micropollutants degradation were studied (i) by following ^{13}C -labeled phenanthrene assimilation as main carbon source, which did not allow observing its mineralization and (ii) by exploring the presence of functional genes, which did not allow the detection of the targeted functions. Among the estrogenic, androgenic, dioxin-like and PAH-like activities, PAH-like activity is more expressed in all reactors at the steady state. The different degrees of digestion, through a change in PAH distribution, explain the increase in PAH-like activity in the aqueous compartment of the most digested sludge (and its decrease in the particulate compartment). PAH-like activity is not fully explained by PAH quantification, suggesting the presence of by-products with biological activity and which could be different depending on the metabolic pathway of the microbial communities..

(PhD thesis in French including journal articles in English)

Defended on 20th December 2012 at :



with the financial support of :



ADEME



Agence de l'Environnement
et de la Maîtrise de l'Energie



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement UR50

Avenue des Etangs F-11100 NARBONNE – France

Tel. +00 33 (0)468 425 151 · Fax +00 33 (0) 468 425 160 Email: lbe.contact@supagro.inra.fr

<http://www.montpellier.inra.fr/narbonne/>