

Rapport de Stage de M1 :

"Caractériser le risque microbiologique associé au développement de biofilm lors du stockage d'eaux non conventionnelles."



Encadrants Stage : Ludovic PILLOUX et Emma BOUSQUET

Université : Eric ESPINOSA

Année 2024-2025

Introduction :

L'eau est une ressource vitale et précieuse soumise à diverses pressions croissantes : augmentation de la population, pollution industrielle et impacts du changement climatique. Le dérèglement climatique impacte fortement le cycle de l'eau (**Annexe 1**)¹. En 2023, le GIEC signale une évapotranspiration accrue, des pluies plus irrégulières et une moindre recharge des nappes². Résultat : en 2021, 500 millions de personnes sont touchées par la désertification, 160 milliards m³ d'eau sont pompés en excès chaque année des nappes phréatiques³ et selon ONU-Eau, 3,6 milliards d'êtres humains manquent d'eau au moins une fois par an, un chiffre qui devrait dépasser 5 milliards d'ici à 2050⁴.

En France, selon Météo France, les ressources renouvelables d'eaux (rivières, nappes) ont chuté d'environ 14% sur les périodes "1990-2001" et "2002-2018". Ces ressources dites renouvelables correspondent à l'ensemble des eaux disponibles chaque année, issues du cycle naturel (précipitations et cours d'eau), sans retour direct à l'atmosphère. L'année 2022 a connu 10 mois de sécheresse des sols, avec 35 % du territoire desséché, un record depuis 1959⁵.

Face à cette pression croissante sur la ressource en eau, des réglementations ont été progressivement mises en place à différentes échelles pour encadrer sa gestion, son traitement puis son assainissement.

Selon les pays ou les régions du monde, l'encadrement de la gestion des ressources en eau varie : en Europe, la Directive-Cadre sur l'Eau (DCE), adoptée en 2000, impose d'atteindre le « bon état écologique et chimique » des eaux de surface d'ici 2027. Elle repose sur une gestion par bassin versant — au total 12 en France, métropolitaine et d'outre-mer. Un bassin versant est une zone où toutes les eaux (de pluie, de ruissellement ou de sources) convergent vers un même point, comme une nappe ou un cours d'eau⁶. A l'inverse, au Brésil par exemple, l'eau est un "bien public limité" géré selon l'usage (agricole, urbain), en raison d'un manque d'infrastructures modernes⁷.

Concernant les eaux usées traitées (EUT), la réutilisation des eaux usées traitées (REUT) était jusque récemment limitée à l'irrigation ou à certains usages industriels non alimentaires, depuis l'arrêté du 2 août 2010⁸. Celui-ci classe d'ailleurs les EUT selon leur qualité sanitaire, en prenant en compte les abattements de différentes espèces avant et après traitement. Pour la catégorie la plus exigeante ("A") en termes de sécurité sanitaire, la concentration en *Escherichia coli* (*E. coli*) ne doit pas excéder 250 UFC(Unité Formant Colonie)/100 ml. Pour d'autres bioindicateurs comme les entérocoques fécaux, les phages ARN F-spécifiques (virus qui infectent certaines souche d'*E. coli*) ou les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices, leurs concentrations post traitement doivent être réduites d'un facteur $\geq 10^4$ ⁹. Ces espèces, naturellement présentes dans les intestins humains et donc dans les EUT, sont utilisées car elles sont plus faciles à détecter et sont indicatrices de contaminations fécales¹⁰.

Également au vu des données alarmantes, la tension hydrique est forte et un bon assainissement de l'eau devient crucial. Pourtant, plus de 1,5 milliards de personnes n'ont pas accès à des systèmes d'épuration adaptés¹¹. En France cependant, 89,6 % de la population bénéficiait en 2021 d'un d'assainissement géré en toute sécurité¹². Mais que signifie réellement "assainir" l'eau ?

Assainir l'eau consiste à collecter, traiter puis rejeter ou réutiliser les eaux usées (domestiques, industrielles ou pluviales). Ce système s'est développé en France dans les années 1970, avec l'extension des stations d'épuration¹³. La directive européenne de 1991¹⁴ et la loi sur l'eau de 1992¹⁵ ont renforcé ces exigences.

On distingue l'assainissement collectif (réseaux de canalisations et stations de traitement des eaux usées = STEU)¹³ de l'assainissement individuel (fosses septiques, filtres à sable, phyto-épuration, etc.)¹⁶.

Les méthodes varient selon les régions : les traitements tertiaires et l'ultrafiltration sont davantage utilisés en Europe qu'au Brésil qui, en majorité, utilise des lagunes ou des filtres plantés⁷. Pour améliorer la gestion de l'assainissement dans l'Hexagone, le Code Général des Collectivités territoriales (CGCT) définit trois zones d'assainissement : collectif, non-collectif et pluvial¹⁷.

Comme dit dans sa définition, l'assainissement permet aussi de réutiliser les eaux usées traitées (EUT), une solution de plus en plus envisagée face au stress hydrique¹³. Faut-il vraiment de l'eau potable pour toutes nos activités ? Ne devrions-nous pas élargir l'usage des eaux non conventionnelles (ENC), "eaux non issues directement d'un prélèvement dans la ressource naturelle (EUT, eaux de pluie etc.) et pouvant faire l'objet d'un traitement adapté selon l'usage envisagé"¹⁸?

Face aux objectifs européens, la France vise 10 % de réutilisation de ses EUT d'ici 2030, via le "Plan Eau" mis en place par le gouvernement¹⁹.

Avec seulement 1 % de REUT aujourd'hui, elle reste en retard par rapport à la moyenne européenne (2-3 %), l'Espagne (> 20 %) ou Israël (~ 90 %) qui est le leader mondial²⁰.

La réglementation s'est donc assouplie récemment : un décret datant d'août 2023 suivi de deux arrêtés parus en décembre 2023 autorisent davantage l'arrosage des espaces verts et agricoles, abrogent le contrôle de la qualité des EUT et intègrent la REUT au Code de l'Environnement²¹.

Cependant, les freins empêchant l'augmentation de la réutilisation des EUT en France sont multiples : cadre réglementaire très strict jusqu'en 2022, faible acceptabilité sociale et coûts d'adaptation des réseaux (stockage, distribution).

Enfin, les risques humains demeurent (micro-organismes, micropolluants, métaux lourds connus)^{22,23} et la réglementation actuelle ne les couvre pas encore entièrement. Effectivement, des bactéries aquatiques pathogènes pour l'Homme (*Legionella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*) peuvent persister dans les réseaux, tandis que les blooms saisonniers (proliférations rapides) de cyanobactéries dans les eaux de surface libèrent potentiellement des toxines dangereuses²⁴.

Le stockage des EUT — indispensable pour compenser le décalage saisonnier entre disponibilité en eau (pluie, fonte des neiges) et besoins agricoles (été)²⁵ — est l'étape la plus propice à la prolifération de pathogènes opportunistes²⁶. En effet, durant ce stockage, les bactéries s'accrochent aux parois et forment un biofilm²⁸. Ce qu'on appelle biofilm est le fait que les bactéries adhèrent à une surface et sont incluses dans une matrice extracellulaire qu'elles produisent, composée essentiellement de polysaccharides, protéines, ADN extracellulaire et lipides. Elles résistent davantage aux traitements appliqués (UV, chloration, ozonation, traitements biologiques) sur ces eaux usées, que sous forme planctonique^{29,29}.

Habituellement dans les eaux, les différentes espèces microbiennes vivent ensemble et une sorte d'équilibre se crée : les amibes libres (FLA), protozoaires unicellulaires eucaryotes (10-30 µm) phagocytent différentes bactéries pour se nourrir — on parle couramment de "broutage" dans la littérature scientifique³⁰. Toutefois, certaines bactéries pathogènes opportunistes échappent à la digestion et se multiplient au sein du cytoplasme des FLA : elles sont désignées comme "Bactéries Résistantes aux Amibes (ARB)"^{31,32}. Ce phénomène est particulièrement observé dans les systèmes de stockage d'EUT, au sein de ces biofilms, où les conditions sont favorables à l'interaction prolongée entre micro-organismes²⁹. Il peut également être renforcé par certains traitements de l'eau qui laissent subsister les FLA et favorisent indirectement la persistance des ARB comme *Legionella pneumophila*³³. C'est une bactérie presque exclusivement intracellulaire, qui

est connue pour se nicher principalement dans l'environnement au sein de l'espèce d'amibe "*Acanthamoeba castellanii*", également pathogène opportuniste³⁴. Elle nous intéresse de par son potentiel infectieux. D'autres espèces d'amibes sont connues pour vivre dans les eaux douces telles que *Hartmannella vermiformis* ou *Naegleria fowleri*³⁵.

Cette interaction complexe entre micro-organismes dans les eaux stockées, et notamment la capacité des bactéries pathogènes à persister au sein des amibes libres, soulève des questions importantes sur le risque microbiologique associé aux biofilms²⁹. C'est précisément ce contexte qui motive l'étude de mon stage, visant à mieux comprendre ces dynamiques lors du stockage d'eaux non conventionnelles.

Celui-ci s'inscrit dans le cadre du "Living Lab Toulouse Métropole", une plateforme d'expérimentation en conditions réelles dédiée aux usages innovants de l'eau en milieu urbain (**Annexe 2**)³⁶. Ce Living Lab fait partie du projet "Défi Clé Water Occitanie" (WOc), financé par la Région Occitanie, qui vise à renforcer la résilience hydrique du territoire face aux défis climatiques et à promouvoir des solutions circulaires, telles que la réutilisation des eaux usées traitées³⁷.

L'objectif de ce stage est d'étudier la formation de biofilms composés de bactéries autres que les marqueurs classiques de contamination fécale (ex. *E. coli*), dans des conditions réelles de stockage d'eaux recyclées.

En les comparant à un modèle de laboratoire, on peut identifier le risque d'exposition à ces bactéries. Caractériser la biodiversité microbienne de ces eaux à l'aide de techniques microbiologiques (cultures) et moléculaires (PCRs) est également un des buts du stage, afin de vérifier que l'on retrouve les espèces pathogènes opportunistes citées dans la bibliographie comme étant présentes dans les EUT : *Chlamydia*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium*³¹. Pour les atteindre, des prélèvements d'EUT ont été effectués à la sortie d'un système particulier de traitement des EU : un filtre planté de roseaux à flux vertical, en l'occurrence celui de l'Université Paul Sabatier (**Annexe 3**)^{38,39}. Des enrichissements d'amibes, des co-cultures de micro-organismes ainsi que leur identification ont été réalisés.

Résumé :

Face à la pression croissante exercée sur les ressources en eau, notamment à cause du changement climatique, de la croissance démographique et de la pollution, la REUT apparaît comme une solution d'avenir. Cependant, le stockage de ces eaux, nécessaire pour pallier le décalage entre disponibilité et usage, favorise le développement de micro-organismes pathogènes, en particulier au sein de biofilms, rendant cette pratique potentiellement risquée d'un point de vue sanitaire. Ce stage s'inscrit dans le projet WOC (Water Occitanie) du Living Lab Toulouse Métropole, et vise à caractériser le risque microbiologique associé au développement de biofilms dans les EUT.

Le travail a consisté à enrichir et isoler des amibes libres (FLA), cultiver des bactéries potentiellement pathogènes (notamment *Legionella pneumophila*) et analyser la dynamique microbienne via des cultures et des extractions d'ADN, sur trois échantillons d'eaux usées traitées, stockées en conditions réelles (intérieur vs extérieur). Les techniques de culture solide ont permis d'observer des fronts amibiens actifs sur *E. coli* mortes, avec des tailles et densités variables selon les conditions de stockage. Des contaminations fongiques ont été observées, notamment en fin de stockage. L'abondance bactérienne a été quantifiée par culture sur TSA : une croissance plus rapide a été constatée dans les EUT stockées à l'extérieur, avec des temps de doublement plus courts. *L. pneumophila* a été capable de former des biofilms surtout sur des milieux riches en lactose et levure (BB et SBB), et peu ou pas sur des milieux glucosés.

Les extractions d'ADN réalisées ont révélé une biomasse microbienne significative dans les EUT, avec des variations selon les conditions de stockage et le moment du prélèvement. Cela ouvre la voie à des analyses PCR pour identifier plus précisément les espèces présentes.

Ce travail met en lumière la persistance de micro-organismes potentiellement pathogènes malgré le traitement des eaux, soulignant l'importance de mieux comprendre les dynamiques microbiennes lors du stockage. Ces résultats appellent à une optimisation des stratégies de REUT, intégrant non seulement les paramètres physico-chimiques mais aussi biologiques, afin de garantir une réutilisation sûre et durable des eaux usées traitées.

Résultats :

1) Mise en évidence de la présence d'amibes libres dans les EUT par filtre planté

L'objectif de l'enrichissement des amibes était d'isoler les protistes, d'éviter un maximum de contaminations et d'obtenir des cultures les plus pures possibles, afin de pouvoir par la suite les passer en culture liquide ("axéniser"), les utiliser pour de la co-culture ou pour pouvoir les identifier.

Comme dit dans le matériel et méthodes, une cinétique a été réalisée : le jour du prélèvement et chaque semaine durant un mois, les boîtes de culture ont donc étéensemencées avec les culots d'EUT centrifugées puis laissées à température ambiante. Elles ont ensuite été observées avant chaque repiquage au microscope Nikon, objectif 10X et les photos ont été obtenues avec la caméra NIKON 5.1 Mpx Cmos Camera DS-Fi3⁴⁰ :

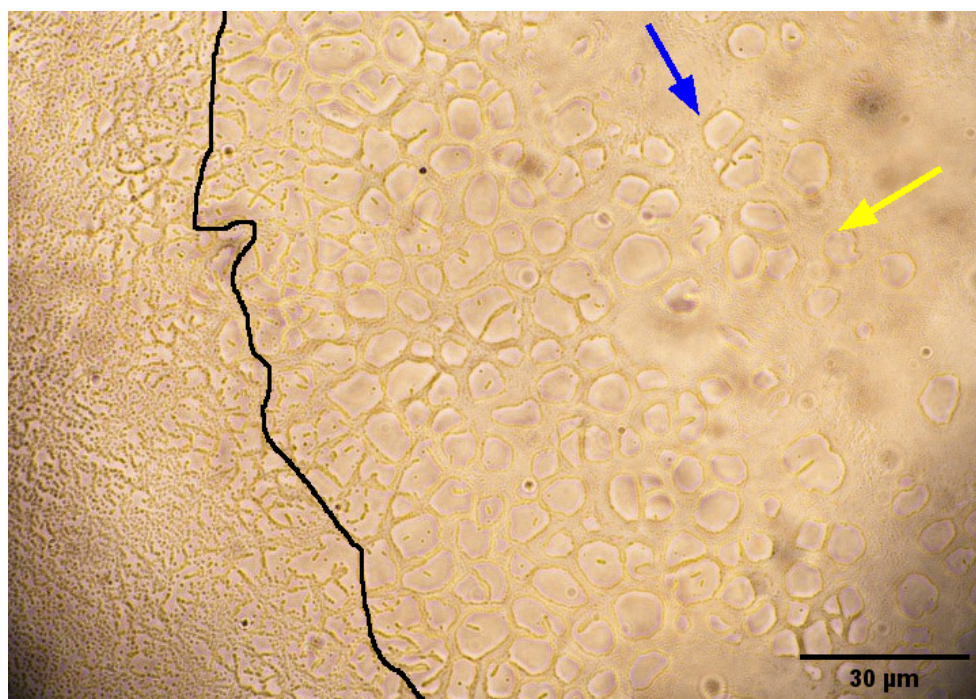


Figure 1 : Front de migration amibien isolé du premier prélèvement d'EUT, après une semaine de stockage (deuxième repiquage)

Observation au microscope optique (grossissement X100)

Ligne noire : délimitation entre bactéries (*E. coli* mortes) (partie de gauche) et le tapis amibien (partie de droite)

Flèche bleue : sens du dépôt de la goutte après l'enrichissement

Flèche jaune : sens d'avancée du front amibien pour venir brouter les bactéries, perpendiculaire au dépôt



Figure 2 : Front de migration amibien isolé du premier prélèvement d'EUT, après deux semaines de stockage (deuxième repiquage)

Observation au microscope optique (grossissement X100)

Ligne noire : délimitation du front : en haut ce sont les amibes et en bas les bactéries mortes

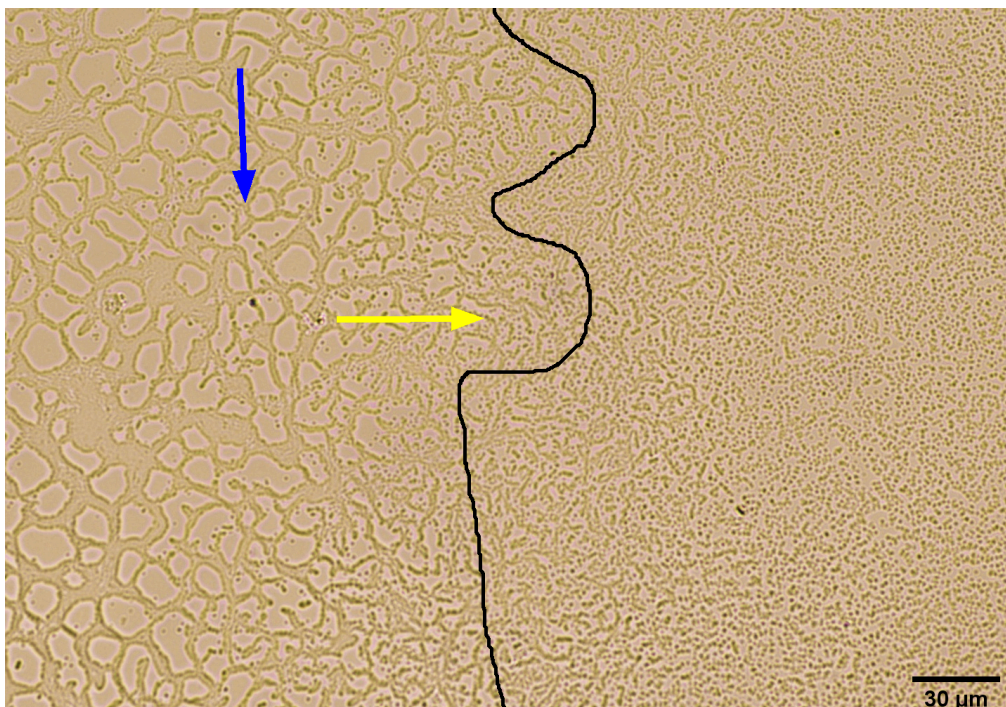


Figure 3 : Front de migration amibien isolé du deuxième prélèvement d'EUT à T0 (deuxième repiquage)

Observation au microscope optique (grossissement X100)

Ligne noire : délimitation du front : à gauche les amibes et à droite les *E. coli*



Figure 4 : Front de migration amibien isolé du deuxième prélèvement d'EUT, après une semaine de stockage (deuxième repiquage)

Observation au microscope optique (grossissement X100)

Ligne noire : délimitation du front : à gauche les *E. coli* mortes et à droite les amibes

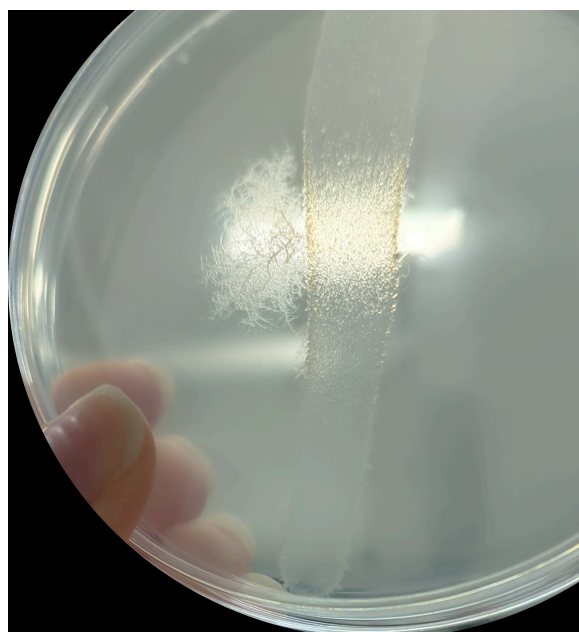


Figure 5 : Sillon de dépôt des amibes isolées du deuxième prélèvement des EUT, après trois semaines de stockage (premier repiquage)

Observation à l'oeil nu d'une boîte de culture amibienne contaminée

Ligne qui descend : dépôt des 100 μl de l'enrichissement amibien

A gauche de cette ligne : population de champignons

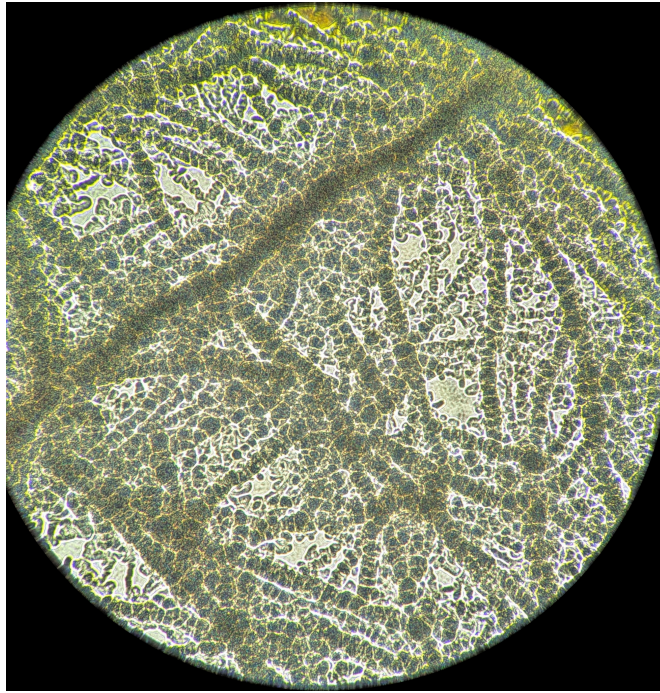


Figure 6 : Contaminations par des champignons d'une boîte d'amibes isolées du deuxième prélèvement d'EUT, après 1 mois de stockage (premier repiquage)

Observation au microscope optique (objectif 10X)

A chaque temps de stockage et pour l'ensemble des prélèvements, des amibes sont présentes. On peut distinguer des phénotypes différents entre les différentes conditions et des fronts amibiens plus ou moins bien délimités. Les amibes ont également une taille différente selon la nature de l'échantillon des EUT : elle varie entre 5 (*Figure 1*) et 60 μm (*Figure 2*) (confère échelles). De plus, ces amibes poussent facilement en se nourrissant seulement d'*E. coli* mortes (pas besoin d'*E. coli* vivantes). Cependant, des champignons ont rapidement contaminé les boîtes, notamment lors du deuxième stockage, en quantités croissantes avec l'augmentation du temps de stockage (*Figures 5 et 6*).

2) Une croissance bactérienne est observée au cours du stockage

L'objectif était de quantifier l'évolution de l'abondance bactérienne (du moins les bactéries qui poussent sur TSA) lors du stockage, en comparant les deux conditions de stockage.

La culture de bactéries sur TSA à partir des EUT a été effectuée seulement à partir du deuxième prélèvement.

Après l'inoculation sur TSA des EUT non centrifugées, les boîtes ont été comptées après quelques jours de croissance à 37°C et les graphiques Excel ont été obtenus :

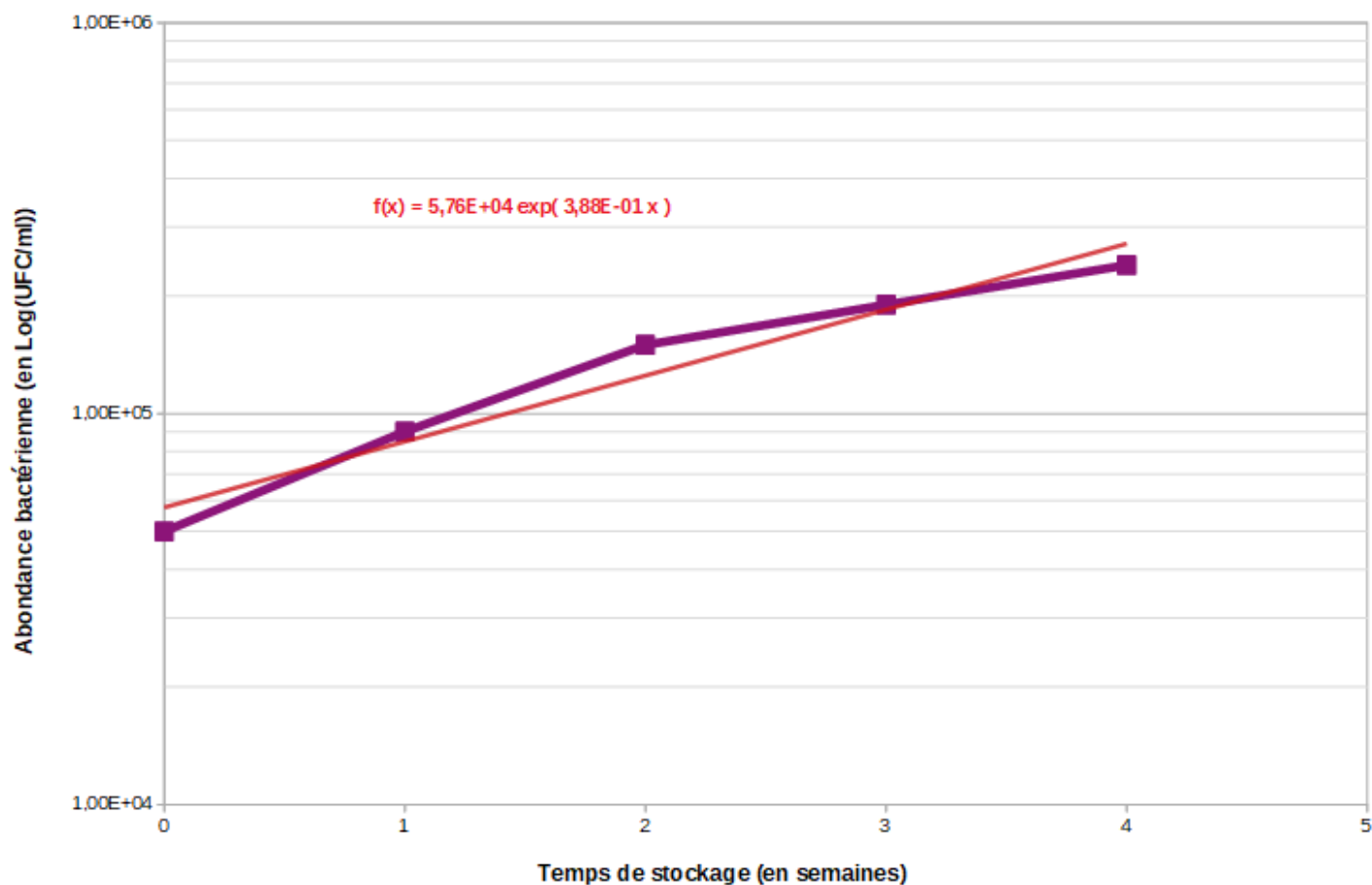


Figure 7 : Abondance Bactérienne (celles qui ont poussé sur TSA) des EUT stockées à l'extérieur

Courbe violette : courbe de croissance bactérienne

Droite rouge : courbe de tendance exponentielle

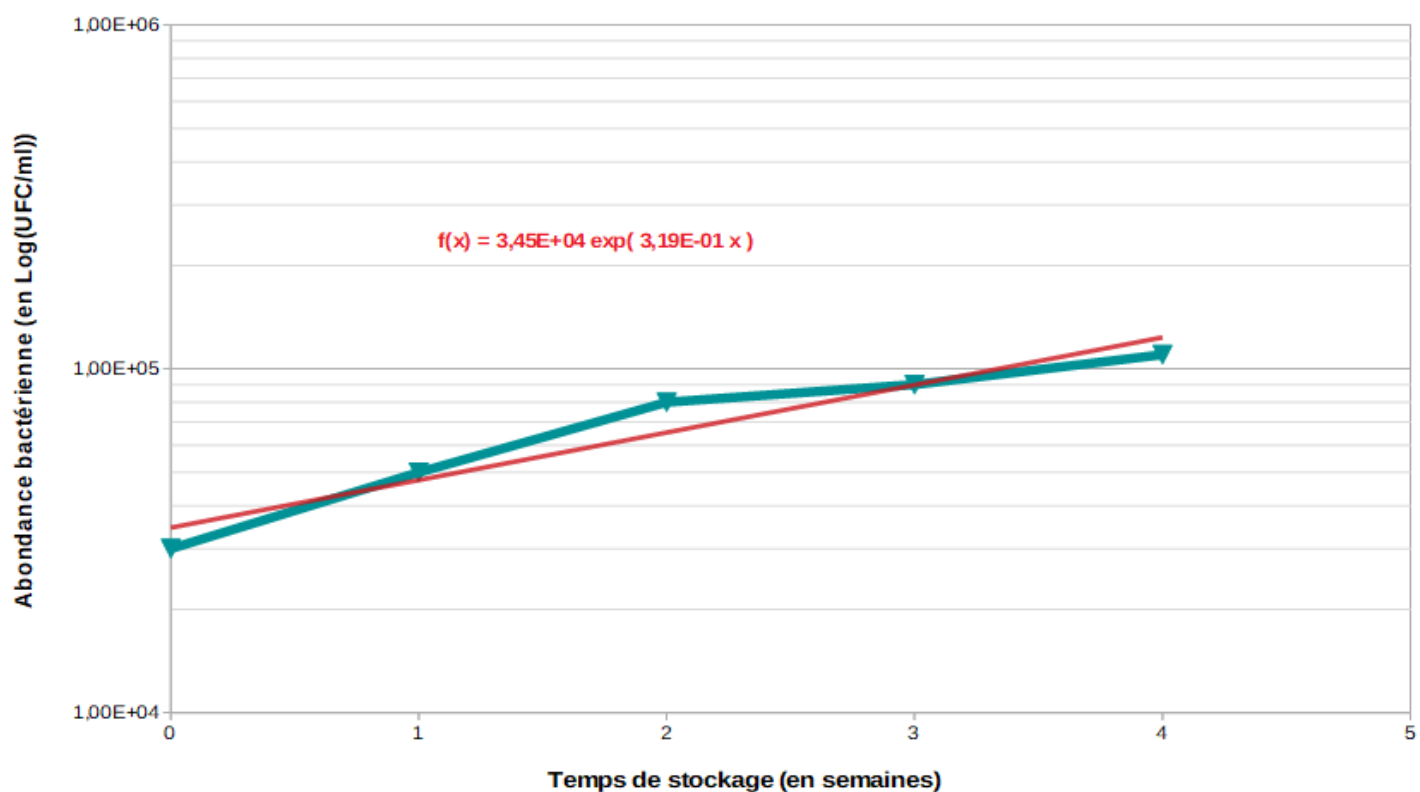


Figure 8 : Abondance Bactérienne (celles qui ont poussé sur TSA) des EUT stockées à l'intérieur

Courbe bleue: courbe de croissance bactérienne

Droite rouge : courbe de tendance exponentielle

Visuellement, on voit que dans les deux conditions, le nombre de bactéries augmente au cours du stockage et les concentrations bactériennes de départ (T0) (“petit a”) sont du même ordre de grandeur pour les deux conditions de stockage d’EUT. Les vitesses de croissance sont également similaires (confère “petit b” de l’équation) et dans les deux conditions entre le début du stockage et la fin, les concentrations ont augmenté de + 1 log (d’un facteur 10).

Les temps de doublement “apparent” entre chacun des points et entre le T0 et le T4 de chacune des conditions ont été calculés selon le calcul décrit dans le matériel et méthodes. **A noter que ces temps de doublement reflètent la dynamique globale uniquement car les bactéries présentes dans les EUT n’ont pas été identifiées.**

Les résultats sont les suivants :

Tableau (Figure 9) : Temps de doublement globaux de la population bactérienne des EUT du prélèvement 2

	Temps de doublement stockage EXTÉRIEUR (en jours)	Temps de doublement stockage INTÉRIEUR (en jours)
T0-T4	12	15
T0-T1	8	9
T1-T2	9	10
T2-T3	21	41
T3-T4	22	24

Les temps de doublement de population sont plus faibles lors du stockage à l’extérieur que lors du stockage à l’intérieur.

3) Confirmation d’une importante activité microbienne dans les EUT par extraction d’ADN

L’objectif de ces extractions d’ADN d’échantillons d’EUT était de voir si la quantité d’ADN était assez importante pour pouvoir effectuer des PCRs par la suite afin d’identifier les espèces microbiennes présentes dans ces EUT.

L’extraction d’ADN a fonctionné pour l’ensemble des échantillons à différents temps de stockage du premier prélèvement d’EUT : Le rapport A260/A280 nm environ égal à 2 entre la quantité d’ADN et de protéines en témoigne.

Pour le second prélèvement, lors de l’analyse au Clario Start⁴¹, les valeurs de concentration en ADN étaient aberrantes (négatives pour certains échantillons), malgré certaines conditions dont le rapport A260/280 nm était correct. Ce sont donc les valeurs obtenues avec le petit spectrophotomètre Nanodrop de l’IPBS (plus adapté à la quantification d’acides nucléiques) qui ont été utilisées.

A partir des valeur obtenues, les graphiques suivants ont été réalisés grâce à un tableur excel :

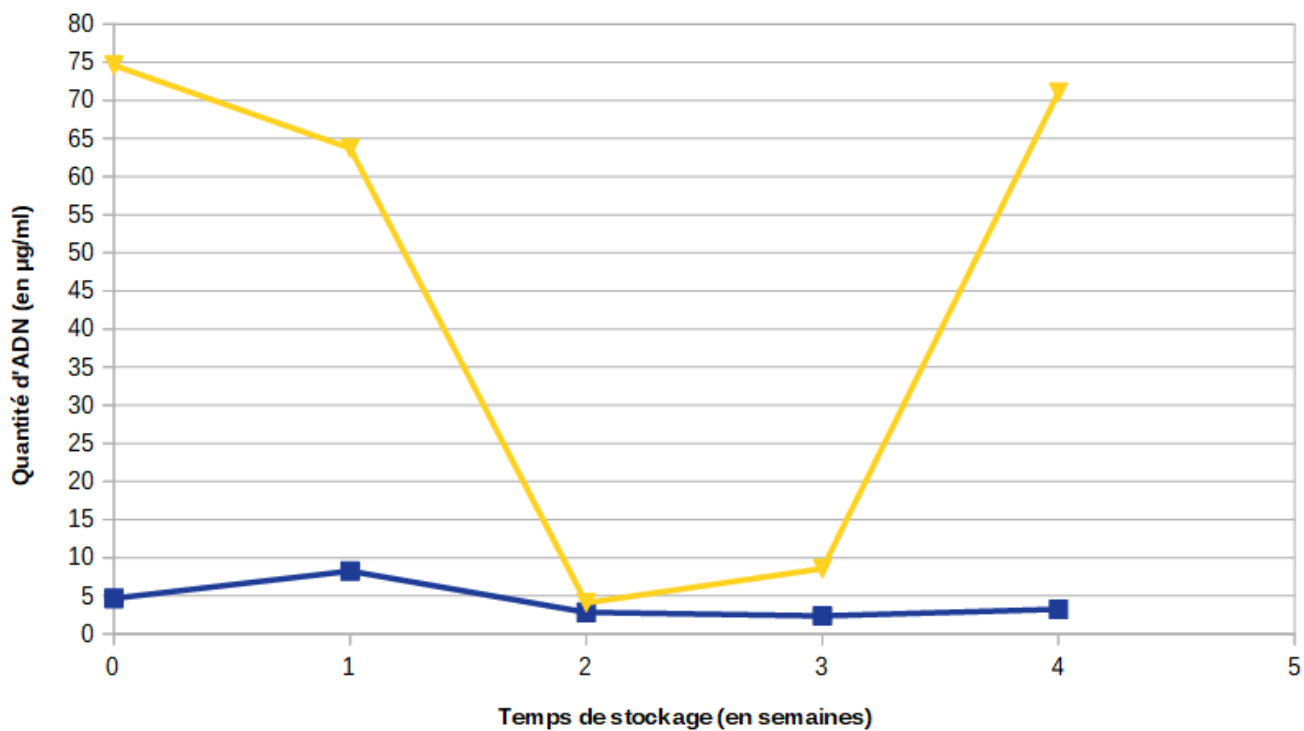


Figure 10 : Variation de la quantité d'ADN lors du stockage extérieur des EUT

Courbe jaune : Prélèvement 1

Courbe bleue : Prélèvement 2

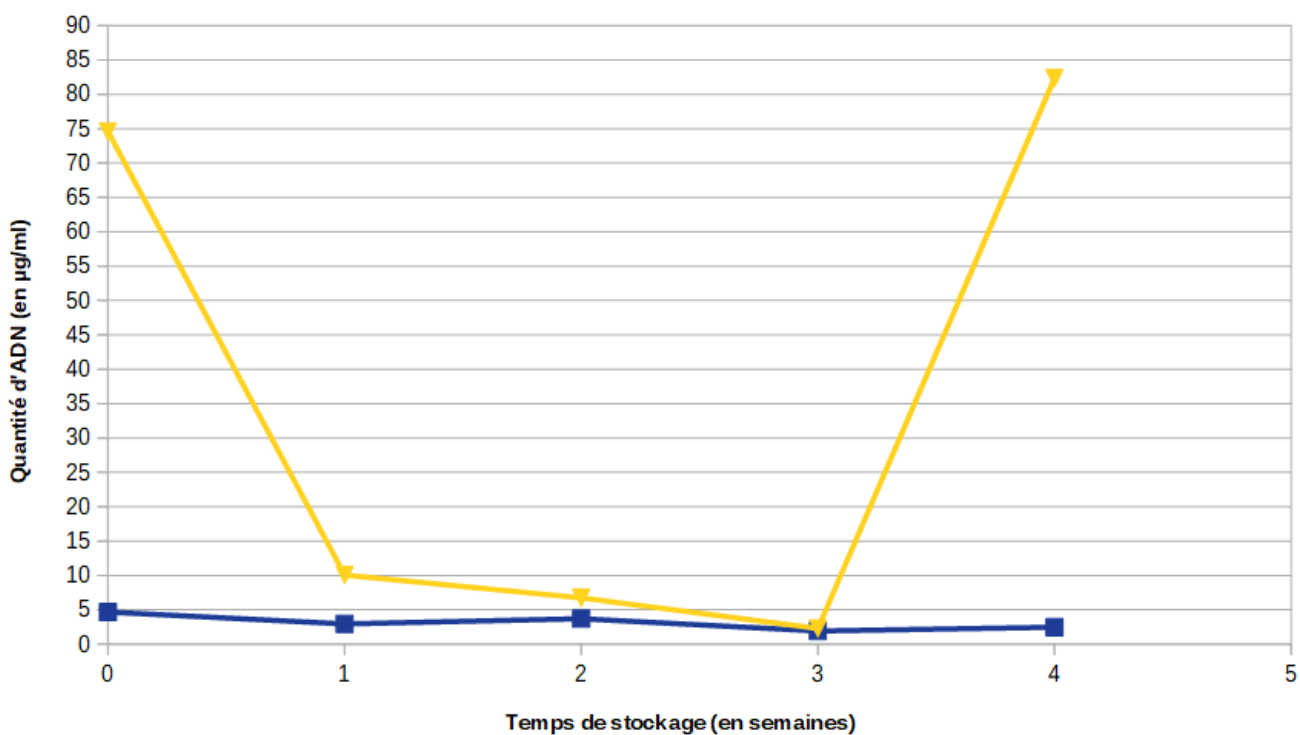


Figure 11 : Variation de la quantité d'ADN lors du stockage intérieur des EUT

Courbe jaune : Prélèvement 1

Courbe bleue : Prélèvement 2

Ces graphiques nous permettent de voir d'abord globalement que la quantité d'ADN est plus faible chez les échantillons d'EUT du deuxième prélèvement (*Courbe bleue*) que chez ceux du premier (*Coube jaune*).

Lors du stockage **extérieur** (*Figure 10*), la quantité d'ADN a chuté progressivement puis brutalement durant les deux premières semaines de stockage des EUT du premier prélèvement. Elle a ensuite réaugmenté durant les deux semaines suivantes pour revenir environ à la concentration initiale. Quant à la quantité d'ADN des EUT du deuxième prélèvement, elle est restée constante pendant tout le mois de stockage. Lors du stockage **intérieur** (*Figure 11*), le même scénario s'est à peu près répété, mais la quantité d'ADN des EUT du premier prélèvement a chuté brutalement dès la première semaine, jusqu'à la troisième puis est remontée rapidement pour atteindre une valeur légèrement au-dessus de celle initiale.

Remarque concernant l'électrophorèse réalisée et décrite dans le matériel et méthodes : les données du gel n'ont pas pu être interprétées.

4) Optimisation du modèle de formation de biofilms à *L. pneumophila*

L'objectif de l'expérience était de voir si *Legionella pneumophila*, le modèle de laboratoire choisi, arriverait à former des biofilms sur 4 milieux testés, référencés dans la bibliographie, précisément dans cet article⁴². C'est une manipulation préliminaire pour les expériences suivantes (co-culture notamment).

Après 10 jours, les biofilms ont été récupérés, inoculés sur boîte de BCYE et 48 après, le comptage des colonies de *Legionella pneumophila* a pu être effectué :

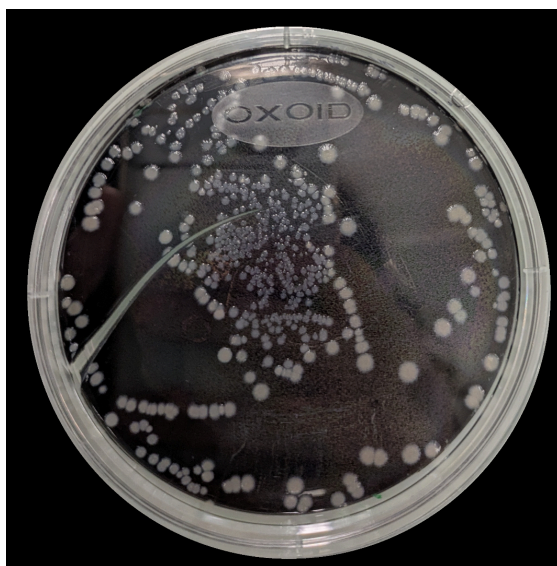


Figure 12 : Culture sur BCYE⁴³ de biofilms de *Legionella pneumophila* après 48 h

Concentration de départ : 10^5 UFC/ml, dans du SBB

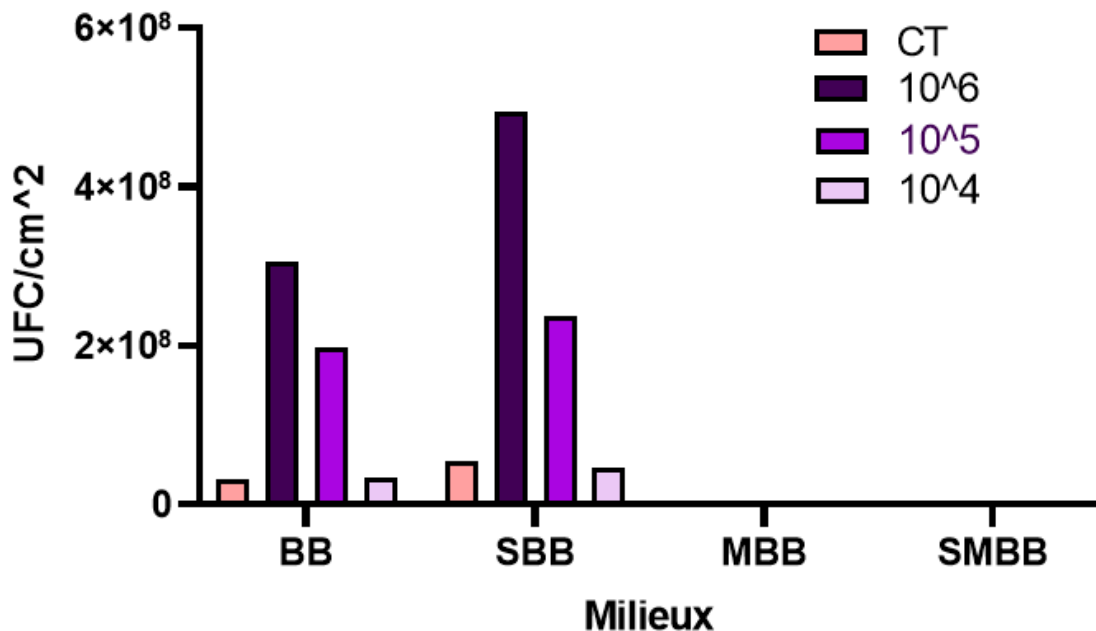


Figure 13 : Histogramme présentant la concentration sous forme sessile de *L. pneumophila*, selon le milieu utilisé

BB : lactose et extrait de levure

SBB : lactose, extrait de levure et supplément pour *Legionella*

MBB : glucose

SMBB : glucose et supplément pour *Legionella*

(Figure 13) : On peut remarquer que *Legionella pneumophila* forme des biofilms sur des milieux dont la source de carbone est du lactose et qui sont assez nutritifs car le BB et le SBB contiennent de l'extrait de levure. : la formation de biofilms se fait quand même davantage dans le milieu SBB que le BB (Illustration Figure 12). En revanche, sur des milieux contenant seulement du glucose comme source de carbone, la bactérie n'adhère pas du tout aux surfaces. Ce graphique permet de voir aussi que plus l'inoculum de départ est important, plus le biofilm est présent en quantité ($10^6 > 10^5 > 10^4$ UFC/cm²).

Pour ce qui est du contrôle (CT), des biofilms se sont un peu formés, ce qui est un résultat peu attendu.

5) Optimisation de la technique d'axénisation des amibes isolées

L'objectif de la culture liquide était que les amibes, une fois isolés, se développent plus vite, afin de pouvoir récolter beaucoup de biomasse pour la biologie moléculaire ensuite : il y a en effet davantage de nutriments en culture liquide par rapport à un milieu solide assez pauvre (type NNA).

La technique décrite dans le matériel et méthodes a été refaite plusieurs fois, en effectuant quelques modifications. Cependant, peu ou pas d'amibes ont pu se développer en culture liquide, dans l'ensemble des trois milieux utilisés.

Discussion :

1. Enrichissement et observation des amibes libres (FLA) :

La présence systématique de fronts amibiens sur les boîtes NNA, quel que soit le temps ou la condition de stockage, confirme que les EUT issues du filtre planté constituent un réservoir riche en amibes libres. La variété morphologique observée – de 5 µm à 60 µm de diamètre – suggère une communauté composée à la fois de petites amibes opportunistes (ex. *Vermamoeba vermiformis*) et de genres plus volumineux comme *Acanthamoeba* ou *Naegleria*. Cette diversité est cohérente avec la littérature, qui décrit les filtres plantés et les réseaux de stockage comme des niches écologiques favorables au maintien de protozoaires pouvant héberger des bactéries pathogènes opportunistes^{44 45}.

La rapidité d'extension des fronts (≤ 7 jours pour atteindre la moitié d'une boîte) témoigne d'une activité trophique soutenue : les FLA se nourrissent efficacement d'*E. coli* mortes, ce qui confirme l'adéquation du protocole d'axénisation. L'apparition récurrente de contaminations fongiques, plus marquée au-delà d'un stockage de deux semaines souligne éventuellement la nécessité de renforcer l'asepsie lors du prélèvement et des manipulations.

En revanche, on ne peut pas savoir s'il se sont développés pendant le stockage des EUT où s'ils étaient déjà présents avant.

2. Croissance bactérienne globale pendant le stockage :

Les courbes de croissance sur TSA montrent une augmentation de l'abondance bactérienne au cours du mois de stockage, quelle que soit la condition. Toutefois, on n'observe pas de grande différence significative de croissance globale entre les deux conditions, mais on peut cependant noter au vu de la comparaison des temps de doublement que les bactéries se multiplient globalement plus vite à l'extérieur. Plusieurs facteurs pourraient dans ce cas-là expliquer cette différence :

- La température : les prélèvements, notamment le deuxième, ont été effectués lorsqu'il faisait relativement chaud et les EUT stockées à l'extérieur ont été soumises à ces températures élevées. Or, la majorité des Entérobactéries et des *Pseudomonas* se multiplient deux fois plus vite entre 20 °C et 30 °C⁴⁶.
- Le rayonnement UV : les bidons opaques limitent les UV létaux, mais la lumière qui passe peut favoriser des bactéries phototrophes facultatives, accroissant encore la biomasse : c'est un biais lié aux conditions de l'expérience⁴⁷.

Sur le plan de la santé publique, cette multiplication bactérienne lors du stockage, notamment à l'extérieur, est préoccupante : les réservoirs agricoles ou urbains non enterrés, privilégiés par leurs coûts moins élevés, pourraient constituer des points chauds de prolifération bactérienne, augmentant la charge microbienne avant réutilisation des EUT^{26,48}.

3. Biomasse microbienne et extraction d'ADN :

Les quantifications d'ADN confirment l'existence d'une biomasse conséquente qui subsiste malgré les traitements en amont. La chute initiale observée pendant les deux premières semaines, suivie d'une remontée, pourraient être

expliquées par plusieurs hypothèses : cela pourrait traduire une mortalité liée au stress de stockage (sédimentation, appauvrissement en nutriments), puis l'établissement d'un biofilm stable qui recycle la matière organique libérée par autolyse cellulaire⁴⁹. Mais dans un grand volume, le stress est moindre.

La variation de la quantité d'ADN pourrait aussi s'expliquer par les différentes compétitions entre les espèces microbiennes au sein de l'écosystème de stockage⁵⁰ (hypothèse plus probable) : certaines meurent au détriment d'autres, qui n'ont pas forcément la même quantité de matériel génétique. Certaines bactéries sont présentes mais ne sont pas cultivables (identifiables en biologie moléculaire uniquement) et l'augmentation de leur abondance pourrait être illustrée par cette élévation de la quantité d'ADN.

D'un point de vue opérationnel, la réussite des extractions (rapports $A_{260}/A_{280} \approx 2,0$) valide la possibilité de réaliser des PCR ciblées. Ainsi, un criblage moléculaire des amibes isolées et des différentes bactéries (16S rRNA universel, *Legionella*-spécifique, *Mycobacterium*, etc.) pourra compléter les données culturales afin de pouvoir obtenir une évaluation qualitative du risque sanitaire.

Au vu de la limite d'efficacité des traitements pour détruire les éventuels pathogènes, cela implique d'optimiser ou de revoir les traitements des eaux domestiques.

4. Formation de biofilm par *Legionella pneumophila* :

La capacité de *L. pneumophila* à former un biofilm dense sur les milieux BB et surtout SBB, riches en lactose et en extrait de levure, confirme ce qui est dit dans la bibliographie, à savoir que les acides aminés et le fer chélaté stimulent l'adhésion initiale et l'excrétion de matrice extracellulaire^{51,52}. À l'inverse, aucun biofilm n'a été détecté sur SMBB/MBB, où le glucose est l'unique source de carbone.

Les milieux BB/SBB serviront donc de référence pour les futures co-cultures FLA-*Legionella*, afin de simuler au mieux les conditions favorables à l'infection des FLA par les ARB.

L'observation d'un léger biofilm dans les puits contrôles indique un problème de stérilité, rappelant que les manipulations doivent être effectuées en prenant davantage de mesures de précautions (changements fréquents de tips, refermer les boîtes plus souvent, etc...)

5. Limites et contraintes de la culture en phase liquide des amibes libres :

L'échec répété de la mise en culture liquide, malgré l'usage de milieux nutritifs (PYG, RPMI) et d'antibiotiques, traduit la sensibilité des FLA aux changements de phase et d'agitation³². Ceci limite la quantité de biomasse disponible pour la transcriptomique ou l'infection bactérienne. Des alternatives sont envisageables :

- Passage progressif solide → semi-solide → liquide pour acclimatation.
- Utilisation de bioréacteurs à faible cisaillement ou de flacons à bouchon ventilé, inspirés des protocoles d'*Acanthamoeba castellanii* en virologie³².

Il est cependant difficile d'obtenir une culture amibienne qui se porte bien car cela demande un suivi conséquent, au détriment de la réalisation d'autres expériences⁵³.

6. Conséquences pour la réutilisation des EUT :

Les résultats confortent l'idée que le stockage est l'étape critique dans une chaîne REUT : c'est là que s'opère l'édification d'un biofilm complexe associant amibes libres (FLA) et bactéries (ARB), dont *Legionella* fait grandement partie. De plus, avec l'augmentation globale de la température, la multiplication des amibes, qui disposent alors d'un plus grand pool trophique (l'ensemble des bactéries), s'accroît, la co-amplification microbienne également, ce qui est critique car un nombre accru de FLA accroît autant de niches potentielles pour les bactéries²⁹. Or, celles-ci représentent un problème de santé potentiel, car elles pourraient également résister à la phagocytose par les macrophages, structures similaires aux amibes, et venir infecter les muqueuses et tissus⁵³. La légionellose par exemple est une infection pouvant entraîner des pneumopathies graves et dont les cas continuent d'augmenter en France(+16 % en 2023 par rapport à 2022)⁵⁴. L'inhalation d'aérosols issus d'arrosage ou de systèmes de refroidissement constitue la voie principale de contamination⁵⁵. Plusieurs recommandations pratiques pourraient être formulées pour pallier ce risque :

1. Limiter le temps de séjour : un délai ≤ 7 jours réduirait l'accumulation de biomasse et l'émergence de communautés matures.
2. Désinfection séquentielle : impulsions d'UV ou de peroxyde d'hydrogène en fin de stockage pour cibler les biofilms naissants⁵⁶.
3. Surveillance intégrée : coupler des PCR quantitatives et le dénombrement des ARB qui infectent les FLA comme indicateurs avancés de risque.

7. Limites du sujet et perspectives :

Trois prélèvements à la même saison ne reflètent pas la variabilité saisonnière ; des campagnes été/hiver sont nécessaires, malgré le fait que les différences de données entre les deux prélèvements peuvent déjà être dues au mois de différence au moment du prélèvement. De plus, selon le mois, la population du bâtiment varie, pouvant expliquer des différences d'abondance bactérienne et probablement des différences en termes de diversité microbienne.

Le séquençage métagénomique permettrait d'identifier les ARB non cultivables, en particulier *Mycobacterium avium* ou *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁷.

Ce travail présente plusieurs limites, notamment liées à l'établissement du premier protocole de prélèvement et à la durée des manipulations. Le protocole complet – collecte d'eau, stockage, enrichissement, culture sur milieu solide puis isolement des amibes – nécessite de nombreuses étapes et sujettes aux contaminations. De plus, chaque prélèvement s'inscrit dans un contexte fortement variable (conditions météorologiques, fréquentation des bâtiments, composition des effluents), ce qui complique la reproductibilité des résultats. Ces aléas imposent un grand nombre de réplicats pour obtenir des données robustes, ce qui excède la durée d'un stage de quelques mois et appelle des investigations à plus long terme.

Au cours des semaines qui me restent, je vais réessayer de former des biofilms de *Legionella pneumophila* dans du SBB, afin de confirmer ma première expérience et pour me situer dans des conditions de manipulations plus représentatives, dans une matrice d'EUT stérilisées.

Si les biofilms se forment bien, je pourrais ensuite inoculer dans un premier temps les bactéries sur les tapis d'amibes de

laboratoire que j'aurai fait pousser dans du PYG liquide (*Hartmannella vermiformis* (ATCC-50237), *Acanthamoeba castellanii* (ATCC-30010) et *Naegleria fowleri* (ATCC 30877). Cela me permettra de dénombrer par la suite au microscope le nombre d'ARB par amibe et donc d'obtenir une quantification du pouvoir infectieux de ces bactéries^{29,32}. L'idéal serait que je puisse comparer ces conditions à des conditions davantage "environnementales", si j'arrive à faire pousser en culture liquide les amibes de mes EUT.

Enfin, l'idée serait de réaliser des PCRs à partir de mes échantillons, avec des amorces ciblant l'ensemble des bactéries ou que certaines connues comme étant des bactéries ubiquitaires du milieu aquatique.

À l'échelle du Living Lab Toulouse Métropole, ces données constituent une première étude vers des lignes directrices locales pour la REUT, conciliant les objectifs du « Plan Eau » (10 % de REUT d'ici 2030) et la protection des populations sensibles (immunodéprimés, personnel agricole, riverains). En élargissant l'étude à d'autres EUT issues d'autres traitements et en co-cultivant les FLA avec les bactéries dominantes identifiées par PCR, il sera possible de préciser la dangerosité de chaque protiste et de modifier voire de créer une nouvelle réglementation concernant le stockage des EUT.

Conclusion générale :

Les résultats confirment que le stockage d'EUT favorise la constitution de biofilms plurispécifiques abritant amibes libres et bactéries pathogènes opportunistes. La vitesse de croissance bactérienne, la biomasse totale et la spécialisation métabolique de *L. pneumophila* sont toutes modulées par la condition de stockage et la composition nutritionnelle. Ces données visent une approche intégrée combinant maîtrise du temps de séjour, contrôle de la matière organique et surveillance microbiologique ciblée afin de sécuriser la réutilisation des eaux usées traitées dans un contexte de raréfaction de la ressource en eau.

Bibliographie :

1. Comment les scientifiques évaluent-ils la pollution et la durabilité des eaux souterraines ?(2024) [\[Lien\]](#)
2. Intergovernmental Panel On Climate Change (Ippc). *Climate Change 2022 – Impacts, Adaptation and Vulnerability: Working Group II Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (Cambridge University Press, 2023). doi:[10.1017/9781009325844](#).
3. L'eau, une ressource vitale | INRAE. [\[Lien\]](#)
4. Un rapport de l'OMM signale une aggravation à l'échelle planétaire de l'insuffisance des ressources en eau et du stress hydrique. *Organisation Météorologique Mondiale*(2024). [\[Lien\]](#)
5. comme presse bilan 2022 site_internet.pdf.-Météo France
6. La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) - Les directives européennes - Le cadre réglementaire - Politiques de l'eau et réglementation - Eau - Environnement - Actions de l'État - Les services de l'État en Côte-d'Or. [\[Lien\]](#)
7. Araújo, R. S. *et al.* Water resource management: A comparative evaluation of Brazil, Rio de Janeiro, the European Union, and Portugal. *Sci. Total Environ.* **511**, 815–828 (2015).
8. *Arrêté Du 2 Août 2010 Relatif à l'utilisation d'eaux Issues Du Traitement d'épuration Des Eaux Résiduairees Urbaines Pour l'irrigation de Cultures Ou d'espaces Verts.*
9. DIRECTION DEPARTEMENTALE.ARS (2018)
10. Li, E., Saleem, F., Edge, T. A. & Schellhorn, H. E. Biological Indicators for Fecal Pollution Detection and Source Tracking: A Review. *Processes* **9**, 2058 (2021).
11. Principaux repères sur l'assainissement. [\[Lien\]](#)
12. Part de la population utilisant des services d'assainissement gérés en toute sécurité en 2021. [Eaufrance](#)
13. CELLARIER, N. Portail sur l'assainissement collectif. [\[Lien\]](#)
14. *Directive 91/271/CEE du Conseil, du 21 mai 1991, relative au traitement des eaux urbaines résiduairees. OJ L vol. 135* (1991).
15. *Décret N°92-1042 Du 24 Septembre 1992 Portant Application de l'article 5 de La Loi N° 92-3 Du 3 Janvier 1992 Sur l'eau et Relatif Aux Schémas d'aménagement et de Gestion Des Eaux. 92-1042* (1992).
16. collectif, P. interministériel sur l'assainissement non. Portail interministériel sur l'assainissement non collectif. *Portail interministériel sur l'assainissement non collectif* (2024). [\[Lien\]](#)
17. Code général des collectivités territoriales - [Légifrance](#).
18. Les eaux non conventionnelles, une solution face à l'augmentation des restrictions d'usages ? | [Cerema](#).

19. Plan d'action pour une gestion résiliente et concertée de l'eau | Ministères Aménagement du territoire Transition écologique. [\[Lien\]](#)
20. SINČIĆ, G. L., Annika BRUNA, Elżbieta KRUK, Gianantonio DA RE, Maxette PIRBAKAS, Ivan Vilibor. Parliamentary question | Developing the potential for reusing wastewater in Europe | E-002057/2022 | [European Parliament](#).
21. Réutilisation des eaux usées traitées : publication de deux nouveaux arrêtés | Ministères Aménagement du territoire Transition écologique. [\[Lien\]](#)
22. Saravanan, P. *et al.* Comprehensive review on toxic heavy metals in the aquatic system: sources, identification, treatment strategies, and health risk assessment. *Environ. Res.* **258**, 119440 (2024).
23. Gosset, A., Polomé, P. & Perrodin, Y. Ecotoxicological risk assessment of micropollutants from treated urban wastewater effluents for watercourses at a territorial scale: Application and comparison of two approaches. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **224**, 113437 (2020).
24. Évaluation des risques sanitaires relatifs à la présence de micro-organismes dans les eaux destinées à la consommation humaine. *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail* (2013). [\[Lien\]](#)
25. english_publication_01_water_resources_and_use.Extract from France's 2021 Environmental Performance Review
26. Falkinham, J. O., Hilborn, E. D., Arduino, M. J., Pruden, A. & Edwards, M. A. Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Health Perspect.* **123**, 749–758 (2015).
27. El Khatib, R., Lartiges, B., Mustin, C. & Skali-Lami, S. Contrôle hydrodynamique de l'organisation des biofilms en milieu eaux usées. *Houille Blanche* 29–33 (2011) doi:10.1051/lhb/2011049.
28. Bonetta, S. *et al.* Impact of wastewater treatment plants on microbiological contamination for evaluating the risks of wastewater reuse. *Environ. Sci. Eur.* **34**, (2022).
29. Taylor, M., Ross, K. & Bentham, R. Legionella, Protozoa, and Biofilms: Interactions Within Complex Microbial Systems. *Microb. Ecol.* **58**, 538–547 (2009).
30. Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S. P. & Maillard, J.-Y. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 231–259 (2010).
31. Loret, J. F. *et al.* Amoebae-resisting bacteria in drinking water: risk assessment and management. *Water Sci. Technol.* **58**, 571–577 (2008).
32. Greub, G. & Raoult, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 413–433 (2004).

33. Santos Gomes, T. *et al.* Presence and interaction of free-living amoebae and amoeba-resisting bacteria in water from drinking water treatment plants. *Sci. TOTAL Environ.* **719**, 137080 (2020).
34. Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D. S. & Greub, G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2428–2438 (2006).
35. Dobrowsky, P. H., Khan, S., Cloete, T. E. & Khan, W. Molecular detection of *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* and *Vermamoeba* (*Hartmannella*) *vermiformis* as vectors for *Legionella* spp. in untreated and solar pasteurized harvested rainwater. *Parasit. Vectors* **9**, 539 (2016).
36. Parache, E. *et al.* Rappel des enjeux et des acteurs du Living Lab.
37. [Défi Clé Water Occitanie.](#)
38. Filtre planté à biodiversité augmentée – TR@NSNET. [\[Lien\]](#)
39. Transition écologique sur le campus de Rangueil : la plateforme de filtres bioinspirés prochainement inaugurée. [Université de Toulouse](#)
40. Lữ Ông N.-K. NIKON 5.1 Mpx Cmos Camera DS-Fi3. *NiVina - Kính hiển vi, thiết bị đo lường* [\[Lien\]](#)
41. CLARIOstar Plus | BMG LABTECH. [\[Lien\]](#)
42. Pécastaings, S., Bergé, M., Dubourg, K. M. & Roques, C. Sessile *Legionella pneumophila* able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms. *Biofouling* **26**, 809–819 (2010).
43. Legionella BCYE Medium Legionella BCYEa Medium | Request for Quote | [Thermo Scientific™](#).
44. CDC - DPDx - Free Living Amebic Infections.(2024). [\[Lien\]](#)
45. Corsaro, D., Pages, G. S., Catalan, V., Loret, J.-F. & Greub, G. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **213**, 158–166 (2010).
46. Saarinen, K., Laakso, J., Lindström, L. & Ketola, T. Adaptation to fluctuations in temperature by nine species of bacteria. *Ecol. Evol.* **8**, 2901–2910 (2018).
47. Hörtnagl, P., Pérez, M. T. & Sommaruga, R. Contrasting effects of ultraviolet radiation on the growth efficiency of freshwater bacteria. *Aquat. Ecol.* **45**, 125–136 (2011).
48. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. (2011).
49. De Plano, L. M., Caratozzolo, M., Conoci, S., Guglielmino, S. P. P. & Franco, D. Impact of Nutrient Starvation on Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*: An Analysis of Growth, Adhesion, and Spatial Distribution. *Antibiotics* **13**, 987 (2024).
50. Song, W. *et al.* The impact of interspecific competition on the genomic evolution of *Phaeobacter inhibens* and

Pseudoalteromonas tunicata during biofilm growth. *Environ. Microbiol.* **26**, (2024).

51. Portier, E., Bertaux, J., Labanowski, J. & Hechard, Y. Iron Availability Modulates the Persistence of *Legionella pneumophila* in Complex Biofilms. *Microbes Environ.* **31**, 387–394 (2016).
52. Declerck, P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* **12**, 557–566 (2010).
53. Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L. & Héchard, Y. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res.* **47**, 6958–6965 (2013).
54. SPF. Légionellose en France. Bilan des cas notifiés en 2023. [\[Lien\]](#)
55. [Legionellosis.](#)
56. Serrà, A., Philippe, L., Perreault, F. & Garcia-Segura, S. Photocatalytic treatment of natural waters. Reality or hype? The case of cyanotoxins remediation. *Water Res.* **188**, 116543 (2021).
57. Rochard, V. *et al.* Presence of Non-Tuberculous Mycobacteria Including Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Associated with Environmental Amoebae. *Anim. Open Access J. MDPI* **13**, 1781 (2023).
58. RPMI 1640, w: L-Glutamine, w: 2.0 g/L NaHCO₃. [\[Lien\]](#)
59. [SVF de haute qualité - FR.](#)
60. Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network | Applied and Environmental Microbiology. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.72.4.2428-2438.2006>.
61. Supplément BCYE Oxoid™ Legionella Chaque flacon permet de fabriquer 100 ml de milieu. [\[Lien\]](#)
62. Jacquier, N., Aeby, S., Lienard, J. & Greub, G. Discovery of New Intracellular Pathogens by Amoebal Coculture and Amoebal Enrichment Approaches. *J. Vis. Exp.* 51055 (2013) doi:10.3791/51055.
63. Microscope inversé de culture cellulaire ZEISS Primovert. [\[Lien\]](#)
64. Silva, A. R., Keevil, C. W. & Pereira, A. Legionella pneumophila response to shifts in biofilm structure mediated by hydrodynamics. *Biofilm* **9**, 100258 (2025).
65. Extraction sur colonne.
66. wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.
67. 10016680.pdf.iQTM SYBR® Green Supermix Instruction Manual
68. Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R. & Jackson, R. B. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4117–4120 (2005).
69. Gel Doc EZ Gel Documentation System | Bio-Rad. [\[Lien\]](#)

Matériel et Méthodes :

Conditions de prélèvement :

D'avril à juillet, trois prélèvements d'eaux usées traitées (EUT) – filtrées par le filtre planté de l'Université de Paul Sabatier - en sortie ont été effectués (Tripliquat biologique) : le premier durant le mois d'avril, le second en mai et le dernier (stockage en cours) à cheval sur juin et juillet. Le filtre est un "démonstrateur de recherche et d'enseignement" et s'organise en couches : un substrat de 80 cm est présent au fond, qui est composé de gravier pour le drainage et de sable fin qui contribue à la filtration. Dans certains pilotes, des vers ont été ajoutés pour renforcer l'épuration puis tout au dessus, des plantes phyto épuratrices (les roseaux entre autres) sont présentes. Le pilote mesure 5 m², est alimenté 56 heures par semaine (du lundi matin au mercredi midi) et filtre 3500 litres hebdomadairement d'eaux usées qui proviennent du réseau de canalisations relié à un des bâtiments de l'université. **(Annexe 3)**^{38,39}.

Une fois prélevées, les eaux ont été stockées dans des bidons en plastique de 5L durant un mois, trois fois également (réplicats biologiques). Deux conditions de stockage ont été reproduites : un bidon a été placé à l'intérieur donc à température ambiante (environ 20°C) et l'autre à l'extérieur.



Figure 14 : prélèvement au niveau du pilote 2, contenant uniquement des plantes phyto épuratrices (absence de vers)

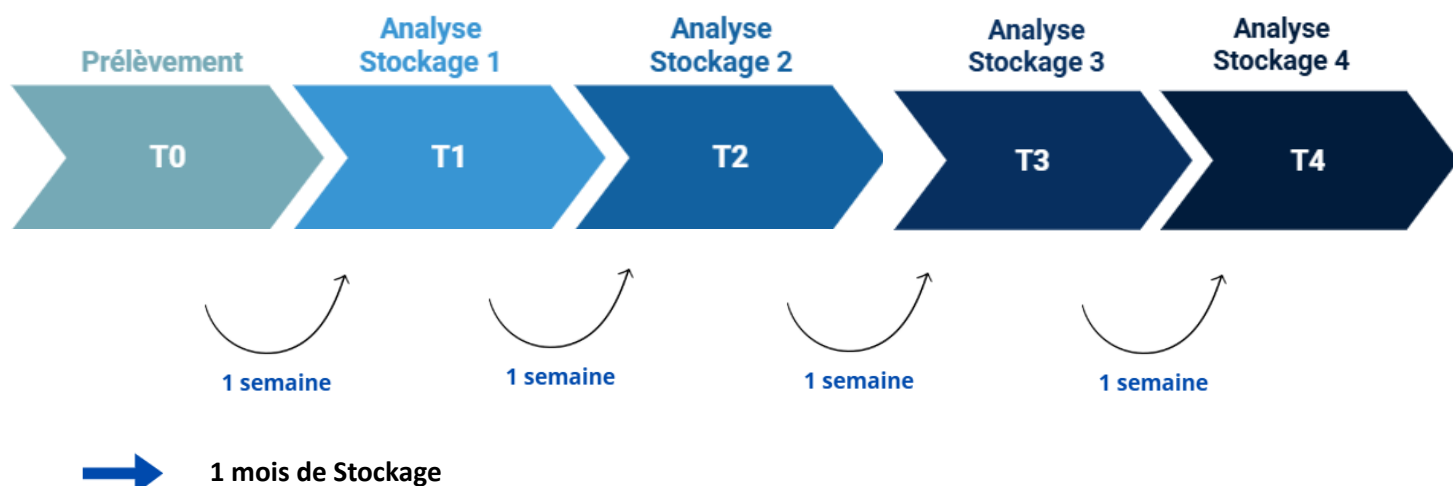


Figure 15 : Cinétique de prélèvement et d'analyse des EUT

Milieux spécifiques utilisés pour l'ensemble des expériences :

Solides : **Milieu NNA**, un milieu solide pauvre : Pour 1 L d'eau distillée stérile (EDS), 0,662 g de Na_2HPO_4 , 0,4 g de KH_2PO_4 et 15 g d'Agar. **Milieu PYG Agar**, milieu nutritif : Pour 1 L d'eau, 20 g de protéase peptone, 2 g de yeast extract, 0,980 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de sodium citrate $2\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 340 mg de KH_2PO_4 , 394 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9 g de glucose, 59 mg de CaCl_2 et 15 g d'Agar. **Milieu TSA** : 40 g d'Agar, QSP 1 L d'eau. Milieu **BCYE** (charbon)⁴³.

Liquides : **Milieu RPMI** (Pan Biotech)⁵⁸, milieu très nutritif. **SVF**⁵⁹. **PAS** (QSP 1L) : 120 mg de NaCl , 4 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 142 mg de Na_2HPO_4 et 136 mg de KH_2PO_4 ⁶⁰. **PYG liquide** (comme le solide mais sans Agar) **SBB 1X (QSP 50 ml)** : 5 ml de BB 10 X (QSP 1L) (0,5 mg de FeSO_4 , 1,25 g de Na_2HPO_4 , 500 mg de KH_2PO_4 , 100 mg de Casamino Acid, 25 mg de Lactose, 100 mg d'Extrait de levure), 500 μl de MgSO_4 100 X (à partir d'une solution de 2 g de MgSO_4 dans 100 ml) et 50 μl de supplément de croissance pour Legionella⁶¹. **BB 1X** : comme le SBB mais sans *Legionella* growth Supplement. **SMBB 1X** : Similaire au SBB mais pas de Casamino Acid, de Lactose et d'Extrait de levure mais 50 mg de Glucose⁴². **EDS** (Eau Distillée Stérilisée). **MBB 1X** : comme le SMBB mais sans supplément de croissance pour Legionella.

Préparation d'*E. coli* pour nourrir les amibes :

Une souche d'*E. coli* (ATCC n°53126) a été utilisée. Pour obtenir des *E. coli* vivantes, des colonies au bout de 24h ont été prélevées et déposées dans du TSB puis le tube a été mis à l'étuve à 37 °C.

Pour obtenir des *E. coli* mortes, les colonies ont été déposées dans du PAS dans une bouteille en verre, puis celle-ci a été mise à 98 °C au bain marie ou à l'autoclave pendant 20 minutes à 121 °C.

Les tubes sont ensuite stockés au frigo à 4°C.

Enrichissement d'amibes et axénisation des amibes isolées :

A) Préparation de l'échantillon : à partir des bidons d'eaux prélevées, environ 200 ml ont été versés dans une bouteille en verre stérilisée, le tout a été homogénéisé avec une pipette 25 ml et 2 fois 50 ml ont été versés dans deux tubes falcon de 50 ml.

B) Protocole : les deux tubes ont été centrifugés à faible vitesse (180 g, 10 minutes). Les surnageants ont été retirés et vidés dans deux autres tubes Falcon 50 (en enrobant les culots) tandis que les culots ont été conservés. Une nouvelle centrifugation des surnageants obtenus a été effectuée, à forte vitesse (10050 g, 10 minutes). Pendant la centrifugation, 500 μl de PAS a été ajouté à un des deux culots obtenus lors de la première centrifugation afin de le resuspendre et le tout a été versé dans le deuxième tube contenant le deuxième culot. 100 μl de cette solution ont été déposés sur une boîte de NNA + *E. coli* mortes ou vivantes et la boîte a été penchée afin de créer un sillon d'inoculation d'amibe. La boîte a été ensuite placée à température ambiante. Les surnageants de la deuxième centrifugation ont été jetés et les culots ont été resuspendus dans du PAS puis congelés pour les futures manipulations de biologie moléculaire (Méthode détaillée dans l'article)⁶².

C) Repiquage : si un front de migration des amibes a été détecté et que le front amibien est arrivé à environ la moitié de

la boîte, après vérification au microscope Nikon à l'objectif 10 X, la boîte est prête à être repiquée. Pour cela, des *E. coli* mortes ou vivantes ont été ajoutées à une nouvelle boîte de NNA. Un petit morceau d'agar au niveau du front de migration a été découpé avec un scalpel stérile et la nouvelle boîte a été inoculée (La ré inoculation peut être répétée plusieurs fois selon la pureté de l'échantillon, afin d'obtenir une culture d'amibe assez pure) : avec le scalpel, le petit bout de gélose a été déposé en haut de la boîte puis a été fait glisser jusqu'à l'extrémité opposée pour recréer le sillon. (Méthode détaillée dans l'article)⁶².

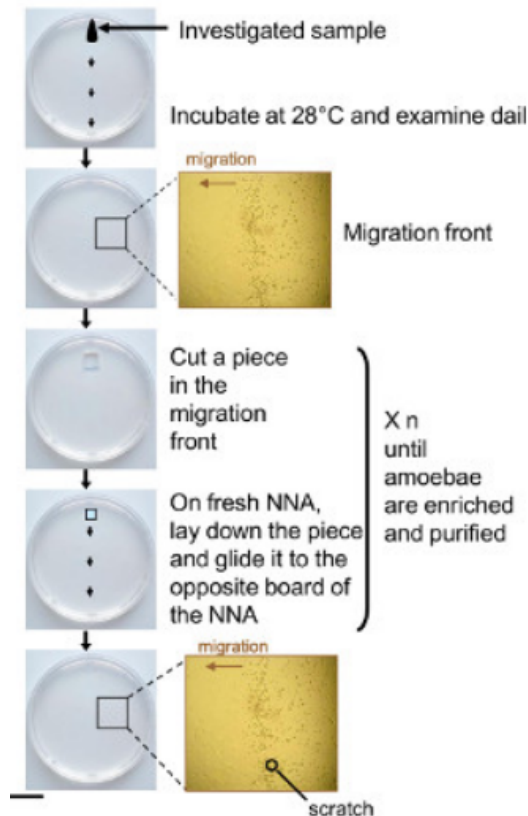


Figure 16 : Méthode d'enrichissement et de repiquage d'amibes suivie⁴⁶

Culture bactérienne des EUT sur TSA :

A chaque temps de stockage de chaque prélèvement, 10 µl d'EUT non centrifugée (INT et EXT excepté à T0) ont été prélevés et versés dans un eppendorf 1,5 ml et des dilutions en série ont été effectuées ($d = 10^{-1}$). 100 µl de la solution à 10^{-3} ont ensuite été déposés au centre d'une boîte de TSA, milieu non sélectif nutritif pour les bactéries. Celle-ci a été placée à 37 °C puis au bout de quelques jours, les phénotypes des bactéries ont été comparées, dénombrées et certaines isolées et congelées pour être ensuite identifiées par PCR.

Un nombre de bactéries a été obtenu à chaque analyse, et pour obtenir une valeur en CFU/ml, ce calcul a été effectué :

- **Nombre compté / 0,1 ml (car 100 µl ont été déposés) X 1000 (facteur de dilution)**. Les CFU/ml ont été transformés en échelle de Log.

-Pour les temps de doublement, un autre calcul a été effectué sur excel :

$Td = t(\text{temps entre les deux mesures en jours}) / (\text{LOG}(t_2/t_1) / \text{LOG}(2))$.

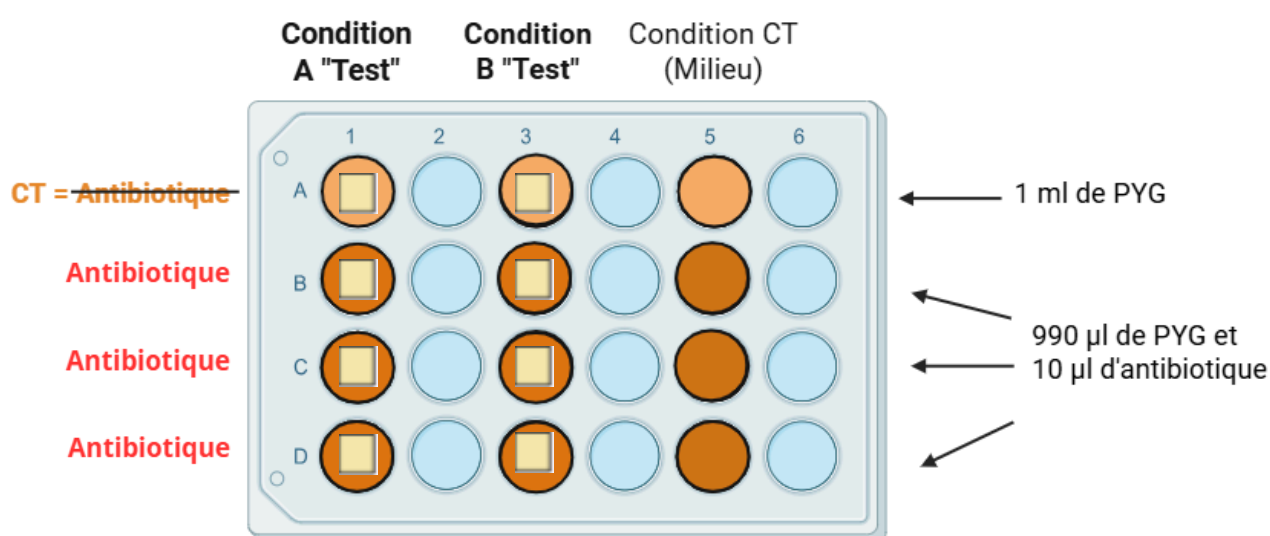
Culture liquide des amibes :

Trois microplaques de 24 puits ont été annotées. Dans chacune d'entre elles, un milieu de culture différent a été utilisé : PAS, PYG ou RPMI. Les conditions A et B ont varié selon les expériences et correspondent aux différentes boîtes de NNA repiquées (absence ou présence d'*E. coli*, mortes ou vivantes, nature du prélèvement etc).

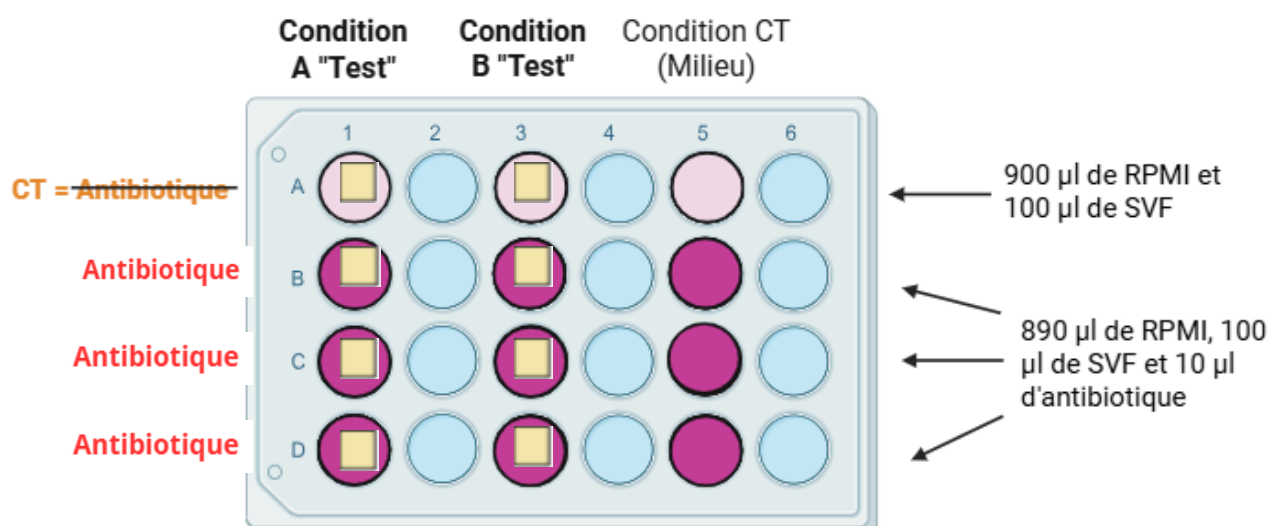
La solution d'antibiotique (100 X) utilisée est composée de Streptomycine et de Pénicilline.

Les différents milieux ont été ajoutés selon les plans de plaque, les puits ont été homogénéisés et des bouts de gélose ont été prélevés au niveau du front amibien des boîtes NNA de culture solide (identifiées selon le prélèvement et le temps de stockage = une pour la condition A et une pour la condition B) puis ont été mis dans les 8 puits "Tests" (même méthode que pour le repiquage solide). Pour ce qui est des contrôles, les 4 puits contenant seulement du milieu et les trois ne contenant pas d'antibiotiques sont des contrôles négatifs. Au bout d'1h-1h30, les bouts de gélose ont été retirés à l'aide d'une pince stérile et les plaques ont été incubées à l'étuve à 28°C. Les puits ont ensuite été observés régulièrement au microscope inversé de culture cellulaire Zeis Primovert⁶³, aux objectifs X10 puis X20.

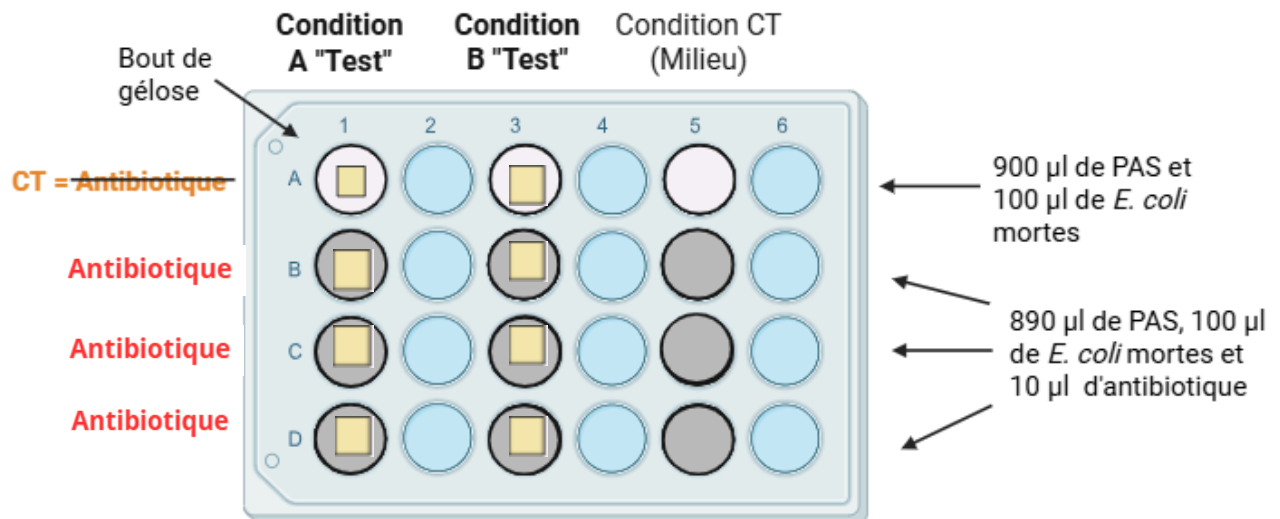
Plan de plaque PYG :



Plan de plaque RPMI :



Plan de plaque PAS :



Formation de biofilms de *Legionella pneumophila* :

4 milieux différents ont été préparés : du BB, du SBB, du MBB et du SMBB (voir Rubrique "Milieux spécifiques utilisés pour l'ensemble des expériences") (Expériences basées sur un l'article⁴²).

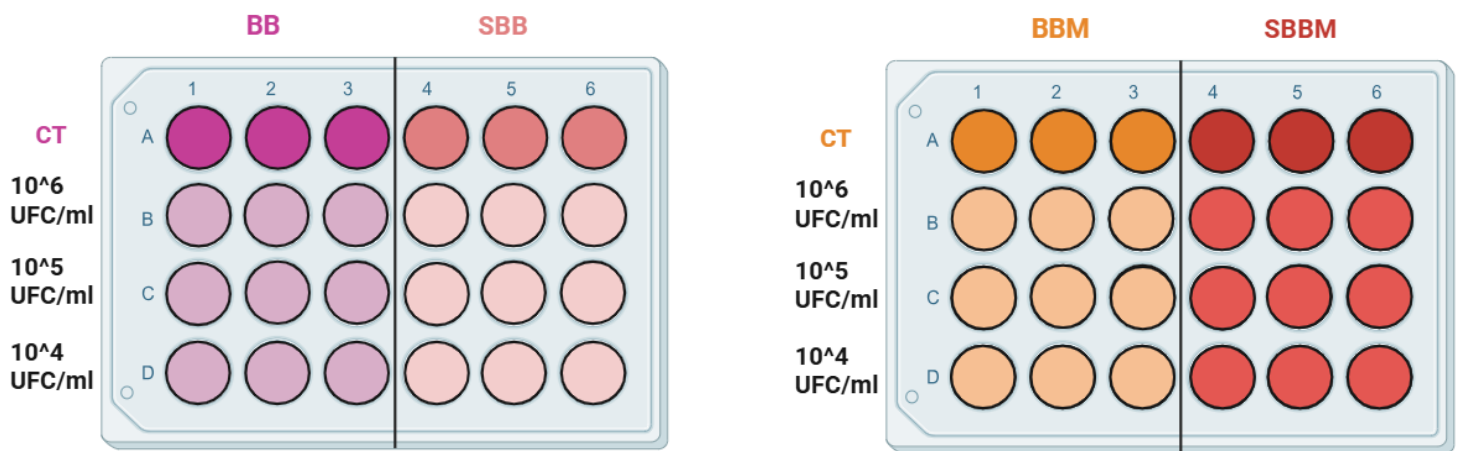
À partir d'une boîte de BCYE, où *Legionella pneumophila* a été inoculée 4 jours plus tôt (temps de croissance de la bactérie), des colonies isolées ont été prélevées avec une oese et déposées dans 4 cuves de spectrophotomètre, chacune contenant un des 4 milieux. La DO a été mesurée à 600 nm et a été ajustée afin qu'elle corresponde à une concentration de départ de 10^6 UFC/ml (DO environ à 0,01)^{42,64}. Ensuite, les suspensions bactériennes de l'ensemble des cuves ont été versées dans chacune 1 tube falcon de 15 ml. Celles-ci ont été diluées afin d'obtenir des solutions de 10^5 UFC/ml et de 10^4 UFC/ml. Dans deux plaques 24 puits, 1 ml de chacun des milieux a été versé par puits (4 fois 3 puits = triplicats pour le contrôle négatif) et 1 ml de chacune des suspensions bactériennes (4 fois 3 concentrations différentes et triplicats par concentration) a également été ajouté dans d'autres puits. (CF Figure 1) La plaque a ensuite été mise à l'incubateur à 37°C. Au bout de 5 jours puis au bout de 7 jours, les puits ont été vidés, lavés avec 1 ml d'eau distillée puis 1 ml de milieu a été ré ajouté. Le 10ème jour, le même lavage a été réitéré et 1 ml d'EDS a été rajouté. Ensuite, chacun des puits a été gratté avec un tips dans 8 directions différentes afin de récupérer les biofilms formés. 100 µl de chacune des conditions (16) ont été prélevés après avoir homogénéisé les puits et vidé dans 16 microtubes qui contenaient 900 µl d'eau distillée (dilution au 10ème). Pour les 4 puits contrôle et les 4 puits dont l'inoculum de départ est de 10^4 UFC/ml, c'est à partir de cette solution bactérienne 10 fois moins concentrée que 100 µl ont été déposés sur respectivement 8 boîtes de BCYE. Pour les 4 puits dont l'inoculum de départ est de 10^5 UFC/ml, ceux-ci ont été dilués au 100ème et les puits à 10^6 UFC/ml, au 1000ème, puis de nouveau 100 µl ont été versés sur 8 autres boîtes. L'ensemble des solutions ont été étalées avec le râtelier. Les boîtes ont ensuite été placées à l'étuve à 30°C.

Comptage : après 48h d'incubation, les bactéries ont été dénombrées. Les valeurs obtenues étaient en UFC/100 µl = UFC/2 cm². Avec un calcul tenant compte des dilutions notamment, les concentrations en UFC/cm² correspondant à la quantité de bactéries adhérentes par cm² de biofilm initial ont pu être obtenues et des histogrammes ont été effectués

sur Graph Pad.

Calcul : $(\text{nombre de colonies comptées} \times \text{concentration de départ} \times d (\text{facteur de dilution}))/2$ (car une boîte fait 2cm²).

Plan de plaques Biofilms de *L. pneumophila* :



Extraction d'ADN des EUT :

Les culots congelés lors de "l'Enrichissement d'amibes" ont été décongelés pour réaliser l'extraction de l'ADN et environ 500 µl de ces derniers ont été ajoutés dans des micro tubes, les tubes ont ensuite été mis à centrifuger rapidement à la petite centrifugeuse. Les surnageants ont ensuite été jetés. Pour la suite, deux techniques différentes ont été testées : pour les échantillons du premier prélèvement, l'extraction n'a pas été réalisée sur colonnes tandis que pour ceux du deuxième prélèvement, si. Les protocoles détaillés de kits Promega ont été suivis ^{65,66}

1) Extraction chimique d'ADN (page 12) : "Animal tissue":

120 µl d'EDTA (chélateur de calcium) et 500 µl de solution de lyse nucléaire ont été ajoutés dans un centrifuge. Celui-ci a été placé dans la glace puis 600 µl de cette solution a été ajouté à l'échantillon dans un nouveau centrifuge. 17,5 µl d'une solution de Protéinase K à 20 mg/ml (enzyme qui dégrade les protéines et stockée à -20°C) ont été ajoutés et le tube a été mis à incuber toute la nuit à 55 °C (température d'activité optimale de l'enzyme), en agitation. 3 µl de RNase A à 4mg/ml (pour dégrader l'ARN) ont ensuite été ajoutés au lysat, le tube a été homogénéisé puis le tout a été placé à 37°C (température d'activité optimale de l'enzyme). L'échantillon a refroidi pendant 5 minutes à TA (température ambiante). 200 µl de la solution de précipitation des protéines ont été ajoutés, le tube a été vortexé à haute vitesse pendant 20 secondes et il a ensuite été mis dans la glace pendant 5 minutes. Le tube a ensuite été centrifugé pendant 1 minute à 14000 G à TA et un culot blanc protéique a pu être observé. Doucement, le surnageant contenant l'ADN a été récupéré, il a été vidé dans un tube contenant 600 µl d'isopropanol (précipitant d'acides nucléiques), a été centrifugé de nouveau 1 minute à 14000 G et le surnageant a été enlevé. 600 µl d'éthanol (précipitant d'ADN) ont été ajoutés, le tube a été inversé plusieurs fois et de nouveau centrifugé. Le surnageant a été aspiré délicatement et le culot a été séché sur du papier absorbant pendant 10 minutes. Enfin, 100 µl de solution de réhydratation ont été ajoutés puis le tube a été placé à 4°C.

2) Extraction d'ADN sur colonne (page 3) :

275 µl de "solution de digestion" ont été ajoutés au microtube : solution de digestion : - 200 µl de solution de lyse nucléaire, 50 µl d'EDTA, 20 µl de Protéinase K, et 5 µl de RNase A et le tube a été incubé à 55 °C pendant 16h. 250 µl de tampon de lyse ont été ajoutés, le tube a été vortexé et le lysat chaud a été transféré sur un assemblage mini colonne + tube de collecte puis a été centrifugé 3 minutes à 13000 G. Le liquide tombé dans le tube de collecte a été jeté et la colonne a été replacée sur le tube. 650 µl de la solution de lavage de la colonne ont été ajoutés, l'assemblage a été centrifugé de nouveau et le liquide du tube de collecte a été jeté. (Cette étape a été répétée 4 fois). L'assemblage sans liquide a été centrifugé 2 minutes afin de sécher le culot, la mini colonne a été transférée dans un nouveau microtube et 250 µl d'eau sans nucléase ont été ajoutés. L'incubation s'est déroulée 2 minutes à TA. L'assemblage mini colonne + tube d'élution a été centrifugé 1 minute à 13000 G et le liquide du tube d'élution a été gardé. De nouveau, 250 µl d'eau sans nucléases ont été ajoutés et l'incubation de nouveau pendant 2 minutes à TA a été effectuée. L'ADN a été stocké à -20°C.

Quantification d'ADN :

Les échantillons ADN des EUT par le filtre ont été quantifiés au lecteur de plaque (Clario Start Plus)⁴¹. L'appareil a été calibré avec la solution fournie dans le kit puis la plaque a été nettoyée à l'éthanol. 2 µl de chacun des échantillons a été déposé sur des interstices où le faisceau de laser passe. La quantité d'ADN en ug/ml a été mesurée à 360 nm. Les solutions du prélèvement 2 contenant l'ADN ont également été quantifiées au Nanodrop qui possède une plus grande résolution, où également 2 µl ont été déposés.

PCRs :

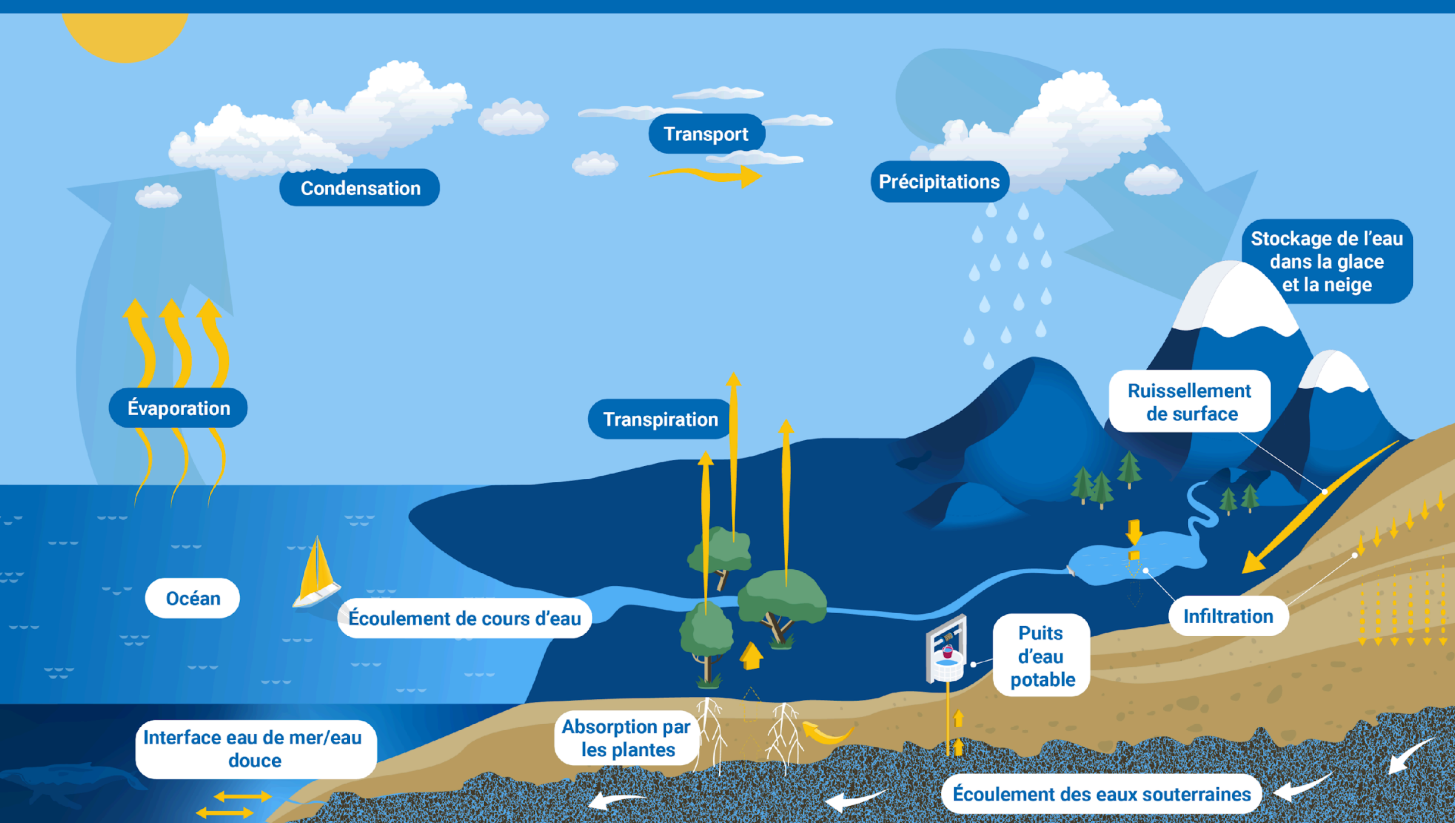
Les échantillons d'ADN d'EUT, produits des extractions, ont été décongelés. Un kit BioRAD iQ a été utilisé et le protocole associé a été suivi⁶⁷. Sous la hotte, 10 µl de iQ Green Supermix, 1 µl de chaque amorce pan*Bacteria* (F (5'-3') = ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG et R (3'-5') ATT ACC GCG GCT GCT GG)⁶⁸(solution mère de 100 µl diluée au 10ème) et 6 µl d'eau ont été ajoutés. A l'extérieur de la hotte, 2 µl d'ADN ont été ajoutés également. Pour le témoin positif, quelques colonies de bactéries (*Legionella pneumophila*) sur boîte ont été ajoutées à la place de l'ADN. Le thermocycleur a ensuite été programmé selon le protocole (35 cycles au total d'élongation) : 95°C pendant 15 secondes, 68°C pendant 45 secondes et 72°C durant la même durée.

Electrophorèse :

Le gel a été préparé avec 1,5 g d'Agarose et 100 ml d'un tampon TAE X dilué 50 fois qui ont été versés dans un erlenmeyer. Après avoir été mis à chauffer au micro-onde, il a été coulé et a séché au bout d'1h-1h30.

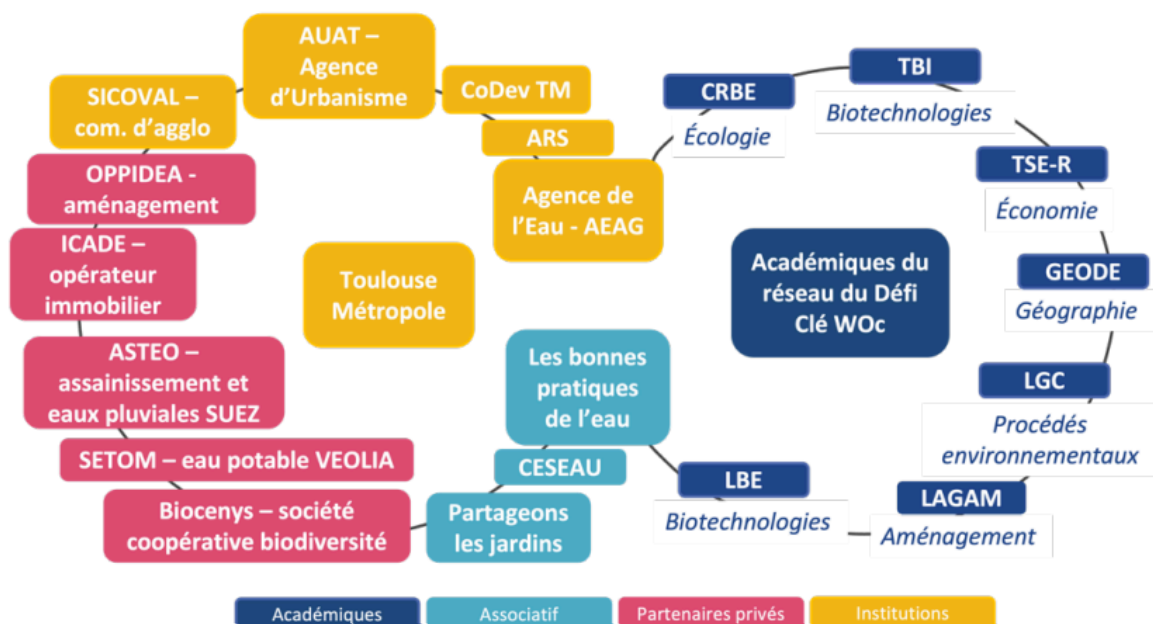
Le peigne a ensuite été retiré et le gel a été recouvert de TAE. 6 µl de Size Indicator (100 bp) ont ensuite été ajoutés dans le premier puits, puis dans l'ensemble des autres puits, un mélange de 10 µl de produit de PCR et 2 µl de Load Buffer ont été ajoutés. La migration a ensuite été lancée à 120 V puis le gel a été analysé au Lecteur de gel⁶⁹.

Cycle de l'eau



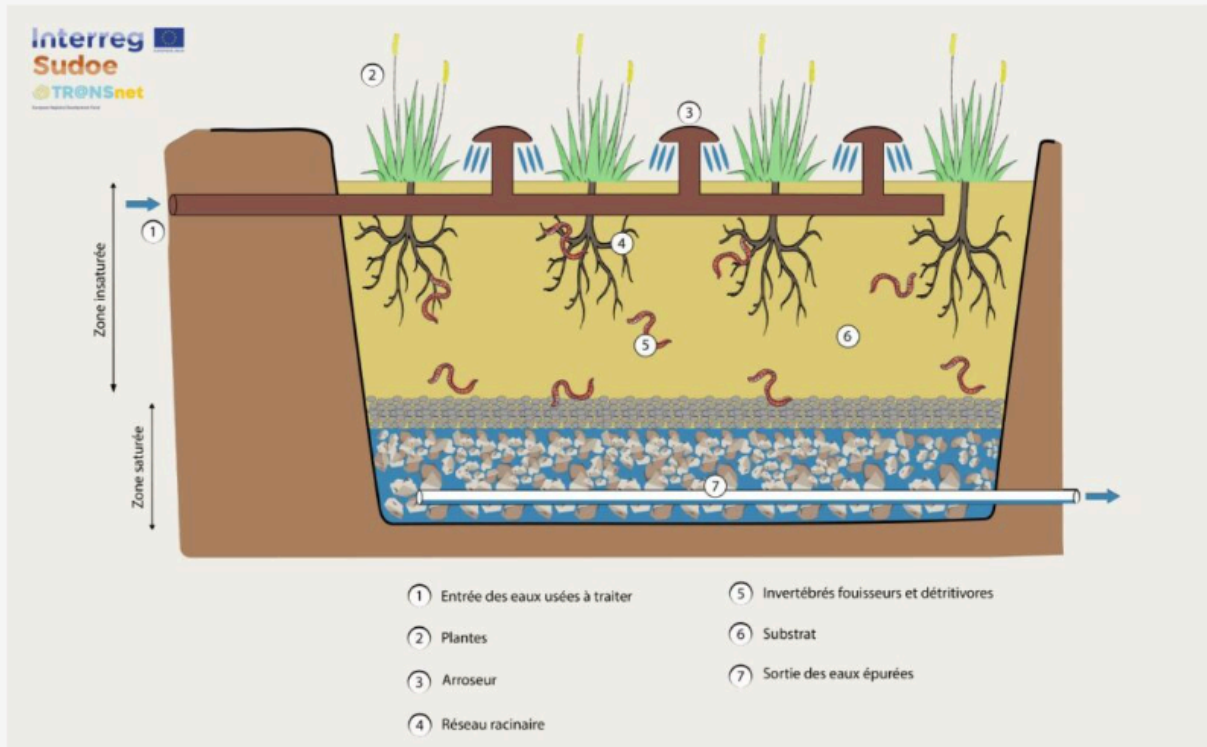
Annexe 1 : Les différentes étapes du Cycle de l'eau

Sources potentielles de pollution des eaux souterraines par l'activité humaine. (Infographie : Adriana Vargas/AIEA)¹



Annexe 2 : Ensemble des partenaires publics et privés du Living Lab³⁶

FILTRE PLANTÉ À BIODIVERSITÉ AUGMENTÉE



Annexe 3 : Filtre planté de l'Université Paul Sabatier : source de prélèvement des EUT
Schéma de son fonctionnement et de sa composition (comme décrite dans le matériel et méthodes)³⁸