

PROGRAMME INTITUTS ET INITIATIVES
Appel à projet – campagne 2021
Proposition de projet de recherche doctoral (PRD)
MSTD - Maîtrise des syst techno durables

Intitulé du projet de recherche doctoral (PRD): MultiReMédia: Approche multidisciplinaire pour la compréhension et l'amélioration des mécanismes intervenant dans la bioremédiation des polluants organiques hydrophobes dans les sols

Directeur.rice de thèse porteur.euse du projet (titulaire d'une HDR) :

NOM : **FAYEULLE** Prénom : **Antoine**
Titre : Maître de Conférences des Universités ou

e-mail : antoine.fayeulle@utc.fr
Adresse professionnelle : UTC - Centre de Recherche de Royallieu
(site, adresse, bât., bureau) Rue du Dr. Schweitzer CS 60 319
60203 Compiègne Cedex

Unité de Recherche :

Intitulé : Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable (TIMR)
Code (ex. UMR xxxx) : EA 4297

École Doctorale de rattachement de l'équipe (future école doctorale du.de la doctorant.e) : **ED71 - Sciences pour l'ingénieur UTC**

Doctorant.e.s actuellement encadré.e.s par la.e directeur.rice de thèse (préciser le nombre de doctorant.e.s, leur année de 1^e inscription et la quotité d'encadrement) : 0

Co-encadrant.e :

NOM : **COLLIN** Prénom : **Sylvie**
Titre : Maître de Conférences des Universités ou HDR

e-mail : sylvie.collin@sorbonne-universite.fr

Unité de Recherche :

Intitulé : Milieux Environnementaux, Interactions et Transferts dans les hydrosystèmes et les sols METIS
Code (ex. UMR xxxx) : UMR7619

École Doctorale de rattachement : **ED398-Géosciences, Ressources Naturelles et Env.**

Doctorant.e.s actuellement encadré.e.s par la.e co-directeur.rice de thèse (préciser le nombre de doctorant.e.s, leur année de 1^e inscription et la quotité d'encadrement) : 0

Co-encadrant.e :

NOM : **Le Goff** Prénom : **Anne**
Titre : Maître de Conférences des Universités ou HDR

e-mail : anne.le-goff@utc.fr

Unité de Recherche :

Intitulé : Biomécanique et Bioingénierie
Code (ex. UMR xxxx) : UMR CNRS 7338

ED71 - Sciences pour l'ingénieur UTC

École Doctorale de rattachement :

Ou si ED non Alliance SU :

Doctorant.e.s actuellement encadré.e.s par la.e co-directeur.rice de thèse (préciser le nombre de doctorant.e.s, leur année de 1^e inscription et la quotité d'encadrement) :1 thèse (Antoine Couderc), 2018, 50%

Cotutelle internationale : Non Oui, précisez Pays et Université :

Selon vous, ce projet est-il susceptible d'intéresser une autre Initiative ou un autre Institut ?

Non Oui, précisez ITE - Institut de la Transition Environnementale

Description du projet de recherche doctoral (en français ou en anglais) :

Ce texte sera diffusé en ligne : il ne doit pas excéder 3 pages et est écrit en interligne simple.

Détailler le contexte, l'objectif scientifique, la justification de l'approche scientifique ainsi que l'adéquation à l'initiative/l'Institut.

Le cas échéant, préciser le rôle de chaque encadrant ainsi que les compétences scientifiques apportées. Indiquer les publications/productions des encadrants en lien avec le projet.

Préciser le profil d'étudiant(e) recherché.

La préservation de la qualité des sols ainsi que leur restauration sont aujourd'hui des enjeux pour les collectivités et sont inscrits dans les engagements politiques de la France. Les techniques de réhabilitation des sols sont divisées en quatre grandes familles selon la nature du traitement : procédés physiques, thermiques, chimiques et biologiques. La bioremédiation est une des techniques les plus prometteuses pour la remédiation des sols impactés par des polluants organiques persistants (POP) en raison de son faible coût et de son impact environnemental réduit. Ces POP représentent une problématique récurrente dans les écosystèmes du fait de leur faible biodégradabilité, leur faible biodisponibilité, leurs propriétés toxiques et leur accumulation dans les chaînes alimentaires. Les composés hydrophobes appartenant à cette catégorie, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), s'adsorbent à la matière organique du sol, et sont peu biodisponibles en phase aqueuse où vivent les microorganismes susceptibles de les dégrader. Un enjeu important est donc d'améliorer la compréhension de l'accès des microorganismes efficaces dans la dégradation à ces polluants dans les matrices des sols pour agir sur leur biodisponibilité sans pour autant favoriser leur transfert vers les nappes phréatiques. Certains champignons filamenteux sont connus pour leur capacité à dégrader ces polluants et considérés comme avantageux par rapport aux bactéries du fait de leurs capacités métaboliques à dégrader des molécules plus complexes comprenant les HAP de hautes masses molaires. Cependant, la dégradation réalisée par ces champignons n'est pas toujours complète et l'interaction avec des communautés bactériennes et d'archées pourrait se révéler intéressante afin de compléter l'élimination des intermédiaires de dégradation. De plus, il a déjà été montré que ces différents types d'organismes pouvaient avoir des effets synergiques sur l'accès aux polluants dans les sols. Des travaux antérieurs ont montré que le champignon tellurique *Talaromyces helicus* est capable de dégrader efficacement le benzo[a]pyrène (BaP), utilisé en laboratoire comme modèle de HAP, aussi bien en culture liquide que dans un sol historiquement contaminé (Fayeulle et al., 2019). Les champignons telluriques sont décrits pour oxyder les HAP en intracellulaire par des cytochromes P450 monooxygénases, ce qui implique une incorporation préalable de ces molécules au sein des cellules fongiques. Cette incorporation a déjà été montrée être liée un processus actif de la cellule impliquant le cytosquelette chez le champignon tellurique *Fusarium solani* (Fayeulle et al., 2014), mais le mécanisme cellulaire précis demeure inconnu, de même que les phénomènes en amont permettant l'accès des surfaces cellulaires au polluant. Pour étudier ce problème, Antoine Fayeulle (microbiologiste, UTC/TIMR) et Anne Le Goff (physicienne, UTC/BMBI) ont mis au point des



Les systèmes microfluidiques permettant l'observation cinétique de la croissance de *T. helicus* (Baranger et al., 2020) et de l'incorporation du BaP par sa fluorescence. Le développement de cette approche nécessite de complexifier la conception des microsystèmes afin d'améliorer la représentativité des matrices de sols, la prédictivité du résultat des approches de bioremédiation et leur efficacité. L'identification des paramètres clés du sol à mimer est pour cela nécessaire.

Au sein de l'UMR METIS (Milieux environnementaux, transferts et interactions dans les hydrosystèmes et les sols), le département Biogéochimie dispose de matériels de prélèvement adaptés pour les sols, l'eau et l'atmosphère, ainsi que des équipements analytiques pour l'extraction (ASE, Speedex Buchi), la concentration/purification des échantillons, l'analyse chimique (3 GC/MS, 1 LC-MS, 1 Py-GC/MS, 1 GC/MS-MS et 1 LC/MS-MS) et l'analyse microbiologique (culture, manipulation, biologie des acides nucléiques avec PCR, accès à qPCR, droplet-PCR, activités enzymatiques). Sylvie Collin s'intéresse aux variations de populations microbiennes en réponse à des contraintes environnementales abiotiques. Les projets concernent l'étude des microorganismes source de lipides utilisés comme des proxies environnementaux, à partir de bactéries ou d'archées enrichies ou isolées de sols naturels, ainsi que les profils de diversité phylogénétique associés aux réponses aux contraintes environnementales. Son expertise réside dans les approches de biologie moléculaire des acides nucléiques et dans l'isolement de souches microbiennes du sol. Elle s'intéresse depuis 2018 à la réponse des microorganismes aux polluants du sol. Katell Quénea est biogéochimiste des sols. Ses thématiques de recherche concernent la dynamique de la matière organique des sols et ses interactions avec les polluants. Elle s'appuie sur la caractérisation de la matière organique des sols et l'utilisation des isotopes stables du carbone, en particulier du ^{13}C . Elodie Guigon s'intéresse aux mécanismes intervenant dans la diffusion et le devenir des micropolluants organiques dans les compartiments physiques (air, eau, sol). Elle est spécialisée dans le devenir des HAP, PCB, phtalates mais aussi des antibiotiques depuis 2012, et récemment d'autres composés émergents (muscs, parabènes) dans diverses matrices environnementales.

Nous envisageons ainsi dans ce projet initiant la collaboration entre les laboratoires de l'UTC (TIMR et BMBI) avec le laboratoire METIS les objectifs suivants:

I) Décrire le processus de bioremédiation du Benzo[a]pyrène (BaP) par *Thalaromyces helicus* à l'échelle de microcosmes (Laboratoire METIS). Les questions scientifiques qui sont ciblées par cette approche conduiront à mieux définir les paramètres à utiliser lors du passage à l'échelle de la microfluidique. Ce sont: 1. Quelle est l'importance de la texture et de la teneur en matière organique du sol dans la dégradation du BaP ? 2. Quelle est la participation du champignon dans le transfert du polluant dans les sols ? 3. Quels sont les autres microorganismes du sol qui participent à la dégradation, et quel est leur degré d'association avec le champignon ?

II) Rendre la culture de microorganismes en microsystème plus représentative des phénomènes ayant lieu lors de la mycoremédiation d'un sol impacté par des polluants hydrophobes (Laboratoires TIMR/BMBI). Les questions scientifiques liées à cet objectif seront: 1. Comment optimiser la conception des systèmes microfluidiques et les paramètres de culture microbienne pour leur permettre de mieux refléter les paramètres mis en évidence comme prédominants lors des études en sol? 2. Comment mesurer la biodégradation et les transferts de polluants à une microéchelle? 3. Les résultats obtenus en microsystèmes sont-ils comparables à ceux obtenus en microcosmes de sol dans des conditions analogues?

La nature du sol étant un paramètre important du devenir du BaP en termes de transfert, biodisponibilité et développement des microorganismes, la stratégie générale consistera à évaluer la capacité de bioremédiation par *Talaromyces helicus* en mettant en place des microcosmes à partir de sols contrastés, et à suivre une série de paramètres permettant de caractériser à différentes profondeurs les caractéristiques pédologiques du sol, la dégradation du BaP, le développement du champignon ainsi que celui de bactéries et d'archées potentiellement associées à la dégradation. Dans cet objectif, les microcosmes seront établis dans des colonnes permettant une analyse par



tranche de la profondeur du sol et des écoulements, sur une durée de 3 mois. La cinétique de dégradation de BaP sera suivie par addition de BaP marqué au ^{13}C soit en présence de la flore microbienne endogène, soit en bioaugmentation avec *T. helicus*. Chaque pas de temps fera l'objet de l'ensemble des analyses microbiologiques, microscopiques et géochimiques décrites ci-dessous. Les microcosmes seront constitués soit d'un sol riche en carbone et de texture argileuse, soit de faible teneur en carbone et sableux. Des analyses initiales permettront de déterminer les teneurs initiales en polluants et en microorganismes capables de dépolluer les HAP, par analyse du profil respiratoire sur plaque Biolog HAP (Khedim, 2018), ainsi que de tester le développement de *T. helicus* dans ces conditions. Le développement du champignon pouvant modifier la texture, cette dernière sera déterminée au cours de l'incubation et la distribution granulométriques des agrégats sera obtenue par une série de tamisages, afin d'évaluer la distribution du BaP et de ses métabolites dans les différentes fractions granulométriques. Les variations de teneur en carbone organique ainsi que la proportion de carbone marqué seront réalisées par analyse élémentaire couplée à un spectre de masse (AE-IRMS) aux différentes profondeurs de la colonne de sol ainsi que sur chaque fraction granulométrique et les eaux d'écoulement. La matière organique et le BaP seront ainsi quantifiés. La matière organique sera également caractérisée par RMN ^{13}C à l'état solide et py-GC/MS. En parallèle, le BaP exogène sera quantifié à chaque pas de temps par GC/MS pour calculer le pourcentage de BaP marqué dégradé. Les métabolites seront analysés de manière qualitative en suivant l'abondance relative des espèces moléculaires sans avoir leur identification précise en raison du marquage au ^{13}C qui complexifie la reconnaissance structurale basée sur les masses. Cette analyse sera réalisée par GC/MS ou LC/MS-MS. En parallèle, la teneur en $^{13}\text{CO}_2$ issu de la biominéralisation microbienne du BaP sera mesurée de manière à pouvoir faire un bilan du devenir du ^{13}C BaP consommé. L'utilisation de BaP marqué au ^{13}C permet d'utiliser des approches de DNA-SIP et de Lipid-SIP pour suivre le développement de la biomasse microbienne ainsi que les variations de diversité phylogénétique au cours du processus de dégradation. Après caractérisation initiale de la population microbienne, le développement des microorganismes sera suivi par PCR quantitative de l'ADNr 16S (bactéries, archées) ou 18S (champignons) à partir d'ADN génomique marqué au ^{13}C ou non marqué, ainsi que par la quantification de gènes bactériens connus pour être impliqués dans la dégradation du BaP. Le développement de *T. helicus* sera suivi par qPCR grâce à des amorces spécifiques qui seront à définir après séquençage du génome. En parallèle, une analyse du marquage relatif des acides gras associés aux phospholipides (PLFA) et de l'ergostérol, spécifique des champignons, sera réalisée par GC-C-IRMS, de manière à confirmer les enrichissements microbiens dûs à la métabolisation du BaP dans les microcosmes. La diversité phylogénétique des microorganismes ayant utilisé le BaP comme source de carbone sera analysée par DNA-SIP suivi d'analyse des profils d'ADNr 16S (bactéries et archées) ou des profils des ITS (champignons) par métabarcoding de l'ADN marqué au ^{13}C , comparé au ^{12}C . Enfin, afin de voir si des interactions physiques sous-tendent le co-métabolisme du BaP et de ses dérivés par *T. helicus* et des bactéries ou archées, des échantillons de mycélium seront enrichis par filtration, prélevés et observés par microscopie à fluorescence. L'objectif est de pouvoir réaliser des études de NanoSIMS sur les hyphes et de pouvoir observer des co-localisations cellulaires qui pourraient être confirmées par FISH en utilisant des sondes spécifiques d'ADNr 16S bactérien ou archéen. L'utilisation des systèmes microfluidiques en conditions dynamiques, c'est-à-dire en présence d'un écoulement, permet de collecter les effluents et de les analyser pour y rechercher la trace de polluants/métabolites solubilisés ou d'enzymes, de la même façon que cela est fait avec les bioréacteurs servant à cultiver des cellules animales. Les systèmes pourront être rincés, pesés et séchés en fin d'expérience pour quantifier la biomasse produite et extraire/doser les polluants restants. D'autre part, des modèles microfluidiques de sol plus sophistiqués, permettant des observations plus fines du comportement des micro-organismes en coculture seront développés. Notamment, on sait que les bactéries telluriques se développent en phase aqueuse mais que celle-ci n'est pas nécessairement continue dans les sols. Les champignons filamenteux, en revanche, possèdent la capacité de se développer dans un sol en dépit de la présence de zones sèches. Nous aimerions tester une hypothèse selon laquelle un des modes de coopération entre champignon et bactéries pour la bioremédiation d'un sol pollué et partiellement sec impliquerait le transport, par le champignon, du polluant de part et



**SORBONNE
UNIVERSITÉ**

d'autre de la zone asséchée, le rendant ainsi disponible pour des bactéries qui ne pourraient y avoir accès du fait de la discontinuité de la phase aqueuse. De plus, les filaments du champignon sont connus pour orienter la distribution spatiale des bactéries dans les sols, et pourraient également leur permettre de franchir des zones sèches. Par ailleurs, l'influence de la forme des canaux, et pas seulement de leur dimension transverse, est attestée par nos travaux antérieurs comme par d'autres équipes. Nous élaborerons donc des modèles de sol plus réalistes, en nous basant sur des caractéristiques de sols réels ou en générant à façon des modèles poreux avec des caractéristiques bien contrôlées.

Publications des partenaires en lien avec le sujet:

UTC: <https://doi.org/10.11159/icepr18.184>; <https://doi.org/10.1098/rsos.191535>;
<https://doi.org/10.1007/s11368-019-02312-8>; <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2324-3>;
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.012>

METIS: Bezzaouya, K. et al. (2019) Congrès National en Santé Environnement, 27-28 nov. Poster. ;
<https://doi.org/10.1007/s00248-020-01650-2>; Vequaud, P. et al. Biogeosciences (En cours de révision).

Merci d'enregistrer votre fichier au format PDF et de le nommer :
«ACRONYME de l'initiative/institut – AAP 2021 – NOM Porteur.euse Projet »

Fichier envoyer simultanément par e-mail à l'ED de rattachement et au programme :
cd_instituts_et_initiatives@listes.upmc.fr avant le 20 février.