

Titre de la thèse	Réponses des biofilms marins aux polluants en zone côtière : une exploration intégrée de la diversité génétique fonctionnelle via la métagénomique et la quantification ciblée par qPCR
Ecole Doctorale	ED548
Laboratoire	MAPIEM
Discipline	Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Directeur(s) de Thèse & Encadrant(s)	Jean-François BRIAND (25%) – Directeur de thèse Elisa CATAO (75%) – Co-Encadrante

## Description du sujet de recherche

(3 pages maximum - contexte scientifique, objectifs, mots clés, références)

### Contexte, originalité et pertinence par rapport à l'état de l'art :

Les perturbations des écosystèmes marins causées par les pollutions constituent un enjeu environnemental et sociétal majeur. Face à cette problématique, l'utilisation d'approches moléculaires omiques pour la surveillance environnementale apparaît comme prometteuse pour évaluer l'état de santé des écosystèmes côtiers et anticiper les impacts des pollutions sur les services écosystémiques marins. Dans le pôle "Microbial Ecology, Biochemistry and Molecular Biology of Biofilms" du Laboratoire MAPIEM, nous étudions les changements des écosystèmes marins via l'analyse des communautés microbiennes (bactéries et microeucaryotes) qui colonisent les surfaces immergées formant ainsi des biofilms.

Ce mode de vie sous forme de biofilm est utilisé comme un potentiel bioindicateur des conditions de l'environnement grâce à ses capacités à se développer sur toute surface immergée, y compris en présence de polluants<sup>1,2</sup>. En milieu d'eau douce, les biofilms sont étudiés comme réservoirs de gènes de résistance aux polluants, surtout aux antibiotiques<sup>2</sup> et aux biocides métalliques<sup>9</sup>. En revanche, ces capacités de réponse au milieu sont très peu étudiées dans l'environnement marin. Les microorganismes qui vivent dans la colonne d'eau en mode planctonique semblent plus affectés par les pollutions métalliques dans la rade de Toulon<sup>3</sup> mais ne permettent pas d'intégrer l'information dans le temps et présentent des biomasses plus faibles limitant les approches méta-omiques. Tandis que une étude préliminaires de notre équipe a montré que la réponse fonctionnelle bactérienne dans les biofilms serait davantage discriminante du gradient de pollution métallique que leur taxonomie<sup>4</sup>. Par ailleurs, il est attendu que les différentes pressions anthropiques mènent à une sélection du potentiel fonctionnel des communautés microbiennes<sup>4,5</sup>. Plus spécifiquement dans le contexte d'écosystèmes côtiers marins, les gènes associés à la tolérance ou la résistance à la contamination métallique<sup>6</sup> et organique présentent un intérêt majeur. La capacité avérée de bioaccumulation de polluants organiques et métalliques dans les biofilms renforce encore l'intérêt d'étudier la réponse génétique des organismes présents<sup>7,8</sup>.

De plus, avec la directive européenne sur milieu marin (DCSMM) et la révision de celle sur le traitement des eaux urbaines résiduaires, la surveillance des mécanismes d'antibiorésistance (Antibiotic Resistance Genes ou ARG) dans les eaux usées deviendra obligatoire à partir de 2028 pour toutes les agglomérations de plus de 100 000 équivalents-habitants. La plupart des études s'intéresse à l'impact des rejets de station d'épuration le long des rivières, mais peu s'intéressent à la transmission de gènes de résistances en milieu marin côtier. Les biofilms sont donc une source d'information épidémiologique pertinente, que ce soit par le génotypage, et donc par l'approche non-ciblée de la métagénomique, ou par les approches quantitatives ciblées comme la qPCR.

La présente thèse se propose ainsi d'étudier les réponses génétiques au sein des communautés microbiennes formatrices de biofilm dans différents contextes de milieux marins confrontés à une pollution anthropique issue de multiples origines. Ceci permettra en particulier de mieux comprendre les risques associés à la dissémination des ARGs en milieu marin. Pour cela, nous tirerons parti de la puissance exploratoire de la métagénomique non ciblée (séquençage de tout l'ADN des biofilms) pour comprendre les mécanismes d'adaptation et identifier des gènes ou groupes taxonomiques marqueurs, puis les valider en les quantifiant via des approches de qPCR. Cette stratégie hybride vise à renforcer la robustesse et la sensibilité de l'approche en s'adaptant à la diversité des contextes environnementaux. L'ensemble du séquençage sera pris en charge dans le cadre de plusieurs projets déjà financés.

### Objectifs :

La thèse proposée se développera autour de deux volets avec des objectifs spécifiques en lien avec des échelles spatiales et des contextes environnementaux différents : 1) biofilms issus de cinq sites portuaires à l'échelle globale, 2) biofilms issus de sites proches pour une analyse à la petite échelle spatiale. L'objectif général visera à : a) l'analyse des métagénomomes de biofilms échantillonnés sur les différents sites, b) identifier les profils fonctionnels spécifiques des communautés microbiennes associées ; c) évaluer l'impact de la pollution via la présence/abondance relative des gènes associés au resistome, i.e. identification de marqueurs fonctionnels.

Pour le premier volet, les échantillons ont été obtenus dans le cadre du projet PAINTS (FRQ-ANR 2020-2024), pour lequel des surfaces plastiques ont été immergées dans cinq sites portuaires avec des caractéristiques physico-chimiques, biologiques et sociétales contrastées à savoir : les rades de Sept-îles (Québec, Canada), Rimouski (Québec, Canada), Lorient (France), du Port sur l'île de La Réunion (France) et Adelaide (Australie). La diversité géographique, couvrant plusieurs bassins océaniques des hémisphères nord et sud, permet d'étudier les réponses des communautés microbiennes à des pressions anthropiques multiples.

Pour le deuxième volet, les campagnes d'échantillonnage ont eu lieu dans la Lagune de Thau et dans la rade de Toulon dans le cadre du projet Bioindic+ (Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse) pour lequel des plaques de polyéthylène ont été immergées au printemps (pour Thau) et pour les quatre saisons (à Toulon), dans des contextes de pollution différenciée à une fine échelle spatiale (de l'ordre du kilomètre).

### Méthodes :

Pour cette étude, les séquences des métagénomomes seront déjà obtenues et les méthodologies incluront l'analyse de génomes assemblés de métagénomomes (MAGs) de biofilms afin d'explorer les gènes liés aux resistomes dans le contexte marin. Le processus commencera par le nettoyage, le contrôle de qualité et la préparation des données métagénomiques. Ensuite, les séquences seront assemblées en contigs à l'aide de logiciels tel que MEGAHIT, suivis d'un mapping des données contre les contigs. Une analyse taxonomique et fonctionnelle sera réalisée via Anvi'o, permettant l'identification des voies métaboliques spécifiques à chaque site, avec une formation de binnings automatiquement avec CONCOCT. En plus de l'affiliation fonctionnelle suite à l'identification des ORFs avec Prodigal et en utilisant les bases de données Pfam et KEGG, les contigs et MAGs seront utilisés pour l'identification des gènes de résistance aux antibiotiques/biocides/métaux en comparaison par blast avec le logiciel DIAMOND et contre les bases de données BacMet, SARG et PanRes. L'alignement de ces séquences sera utilisé ensuite pour le dessin de nouvelles amorces pour la quantification spécifique des gènes le plus abondants pour une confirmation de leur présence, et une validation a posteriori sur des mésocosmes sous la pression spécifique de certains polluants. Ces amorces seront utilisés pour une quantification de gènes spécifiques par qPCR sur un appareil Bio-Rad CFX96 déjà présent au laboratoire MAPIEM. Cette quantification sera réalisée à l'aide de courbes de calibration standardisées et permettra de comparer l'abondance relative de ces gènes entre les différents sites étudiés en recherche de validation de biomarqueurs de pollution.

### Retombées attendues :

→ Développer les connaissances sur les caractéristiques taxonomiques et fonctionnelles du microbiome des biofilms des océans, spécifique dans les zones côtières et en lien avec la pollution marine. Evaluer l'utilisation de la métagénomique comme outil environnemental, notamment pour l'identification de marqueurs génétiques.

Mots clés : Biofilms marins ; écologie microbienne ; signatures fonctionnelles ; pollution anthropique côtières

### Références :

1. Chonova, T. *et al.* River biofilm community changes related to pharmaceutical loads emitted by a wastewater treatment plant. *Environ Sci Pollut Res* **25**, 9254–9264 (2018).
2. Klümper, Uli *et al.* Environmental microbiome diversity and stability is a barrier to antimicrobial resistance gene accumulation. *Commun Biol* **7**, 706 (2024).
3. Coclet, C. *et al.* Changes in bacterioplankton communities resulting from direct and indirect interactions with trace metal gradients in an urbanized marine coastal area. *Frontiers in Microbiology* **10**, 257 (2019).
4. Coclet, C. *et al.* Trace Metal Contamination Impacts Predicted Functions More Than Structure of Marine Prokaryotic Biofilm Communities in an Anthropized Coastal Area. *Front. Microbiol.* **12**, 589948 (2021).
5. Zhang, W. *et al.* Marine biofilms constitute a bank of hidden microbial diversity and functional potential. *Nature Communications* **10**, (2019).
6. Catao, E. C. P., Gallois, N., Fay, F., Misson, B. & Briand, J.-F. Metal resistance genes enrichment in marine biofilm communities selected by biocide-containing surfaces in temperate and tropical coastal environments. *Environmental Pollution* **268**, 115835 (2021).
7. Djaoudi, K. *et al.* Seawater copper content controls biofilm bioaccumulation and microbial community on microplastics. *Science of The Total Environment* **814**, 152278 (2022).
8. Barre, A. *et al.* A comparative biomonitoring study of trace metals and organic compounds bioaccumulation in marine biofilms and caged mussels along the French Mediterranean coast. *Environmental Pollution* **363**, 125239 (2024).
9. Yi, X. *et al.* Globally distributed mining-impacted environments are underexplored hotspots of multidrug resistance genes. *The ISME Journal* **16**, 2099–2113 (2022).

## **Encadrement et conditions matérielles pour le doctorant**

→ La/le doctorante sélectionnée développera les analyses au sein du Laboratoire MAPIEM à l'Université de Toulon, campus de La Garde, sous la supervision d'Elisa Catão et de Jean-François Briand. Cette thèse sera centrée sur des approches de bioinformatique, dont les analyses seront réalisées à distance en utilisant la force de calcul des clusters des plateformes MIGALE du département MalAGE de l'INRAe à Jouy-en-Josas et ABiMS (Analysis and Bioinformatics for Marine Sciences) de la Station Biologique de Roscoff. Des formations seront proposées à l'étudiant(e) pour se familiariser à ses plateformes, en plus du workshop international EBAME, centré sur les analyses de métagénomique et organisé tous les ans en octobre/ novembre par l'Institut Universitaire Européen de la Mer (Brest). Pour compléter et/ou confirmer les réponses spécifiques issues des analyses métagénomiques, des analyses de laboratoire pour la quantification des gènes d'intérêt par qPCR associés à la résistance aux polluants seront réalisées au MAPIEM. Un Comité de Suivi Individuel (CSI) sera enfin organisé à chaque fin d'année, conformément au règlement de l'école doctorale.

## **Compétences attendues et personnes à contacter**

### **Compétences attendues :**

→ Il est souhaitable que le/la candidate présente une formation en écologie microbienne et/ou bioinformatique, avec la maîtrise des outils bio-informatiques pour le traitement de données à haut-débit des métagénomiques.

→ Le/la candidate devra posséder des compétences/connaissances sur la biologie moléculaire (extraction de l'ADN, PCR et qPCR).

→ Un intérêt du /de la candidate pour la microbiologie environnementale des écosystèmes marins sera un plus.

### **Personne(s) à contacter :**

Elisa Catão – [elisa.catao@univ-tln.fr](mailto:elisa.catao@univ-tln.fr) et Jean-François Briand – [briand@univ-tln.fr](mailto:briand@univ-tln.fr)