

L'antimoine, un polluant émergent dans les sols et rivières urbaines : évolution de la diversité et structure des communautés microbiennes totales et métaboliquement actives de sédiments prélevés le long d'un continuum route – bassins routiers.

Claire Da Costa¹, Maëva Philippe^{2,3}, Yannick Colin¹, Pierre Le Pape³, Thierry Berthe^{1,4*}, Fabienne Petit^{1,4}, Corinne Casiot-Marouani⁵, Eléonore Resongles⁵, Rémi Freydier⁵, Louise Bordier², Gautier Landrot⁶, Sophie Ayrault²

¹ UMR CNRS, M2C, Normandie Université, 76821 Rouen, France

² Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement (LSCE/IPSL), Unité Mixte de Recherche 8212 (CEA/CNRS/UVSQ), Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette (France)

³ Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC) UMR 7590, CNRS-Sorbonne Université – MNHN – IRD, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05

⁴ UMR CNRS METIS, Sorbonne Université

⁵ HydroSciences Montpellier, Univ Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France

⁶ Synchrotron SOLEIL, L'Orme Merisiers, F-91190 St Aubin (France)

* thierry.berthe@univ-rouen.fr

Résumé

Cette action a pour objectif d'étudier l'impact d'un contaminant émergent en milieu urbain, l'antimoine (Sb), sur les milieux récepteurs accumulant cette contamination. La diversité des communautés microbiennes totale et active des sédiments du bassin de rétention de Bréthencourt a été étudiée par une approche de méta-taxonomique. Ces deux communautés ont plus de 90% des variants de séquences d'amplicon (ASV) identifiés en commun. Une analyse en coordonnées principales (PCoA) montre que les communautés bactériennes sont bien différenciées au sein des échantillons prélevés le long du continuum route-bassin, mais qu'il n'y a pas de variation significative entre les communautés totales et actives à l'échelle des variants de séquences d'amplicon (ASV). Les communautés microbiennes totales sont majoritairement représentées par des Bacteroidota et Proteobacteria (classes α - et γ -), qui ne constituent pas nécessairement les taxons métaboliquement actifs majoritaires. Des taxons métaboliquement actifs potentiellement impliqués dans les processus de réduction (Dechloromonas) et oxydation (Hydrogenophaga, Thiobacillus, Bradyrhizobium) de Sb ont pu être identifiés et pourraient être responsables des différences de spéciation observées entre les échantillons au sein du continuum route-bassin. Dans ces échantillons, des genres bactériens, connus pour posséder des mécanismes de résistance à Sb et/ou As, ont également pu être identifiés au sein des communautés actives.

Points clefs

- ✓ *Au sein du bassin de rétention, la structure des communautés microbiennes diffère le long du continuum route-bassin.*
- ✓ *Les communautés microbiennes totales sont majoritairement représentées par des Bacteroidota et Proteobacteria (classes α et γ) qui ne constituent pas nécessairement les taxons métaboliquement actifs majoritaires.*
- ✓ *Les sédiments du bassin de rétention hébergent des micro-organismes qui sont décrits pour intervenir dans la spéciation du Sb et/ou posséder des mécanismes qui confèrent une résistance à ce métalloïde.*

Abstract

*The aim of this action is to study the impact of an emerging urban contaminant, antimony (Sb), on the receiving environments that accumulate this contamination. The diversity of the total and active microbial communities in the sediments of the Bréthencourt retention basin was studied using a meta-taxonomic approach. These two communities have more than 90% of the identified amplicon sequence variants (ASV) in common. Principal coordinate analysis (PCoA) shows that the bacterial communities are well differentiated within the samples taken along the road-basin continuum but that there is no significant variation between total and active communities at the scale of amplicon sequence variants (ASV). The total microbial communities are predominantly represented by Bacteroidota and Proteobacteria (classes α - and γ -) which do not represent the main metabolically active genera. Metabolically active taxa potentially involved in Sb reduction (*Dechloromonas*) and oxidation (*Hydrogenophaga*, *Thiobacillus*, *Bradyrhizobium*) processes were identified and could be responsible for the differences in speciation observed between samples within the road-basin continuum. Bacterial genera, known to harbor genes encoding mechanisms conferring resistance to Sb and/or As, could also be identified within the active communities.*

Key points

- ✓ *Within the retention basin, the microbial community structure differs along the road-basin continuum.*
- ✓ *The total microbial communities are predominantly represented by Bacteroidota and Proteobacteria (α and γ classes) which are not necessarily the dominant metabolically active taxa.*
- ✓ *The sediments of the retention basin host micro-organisms that are known to be involved in Sb speciation and/or to harbor mechanisms that confer resistance to this metalloid.*

Contexte et rappel des objectifs

L'antimoine (Sb) est un contaminant toxique émergent en milieu urbain dont les sources principales de rejet sont l'incinération des déchets (Tian et al., 2014) et le trafic routier (Hjortenkrans et al., 2006). Dans le bassin de la Seine, l'augmentation de sa concentration a été observée dès 2002 dans l'air et l'eau (Ayrault et al., 2013). Il est donc nécessaire d'identifier son impact sur les milieux récepteurs accumulant cette contamination à l'échelle des bassins versants urbains.

Les précédents travaux (Philippe et al., 2021) ont montré une évolution des concentrations, mais également des formes chimiques de Sb (spéciation et identification des phases porteuses) en relation avec des processus de réduction et de sulfuration sur un continuum route-bassin de rétention de Bréthencourt. Au sein des communautés bactériennes de ces échantillons, des gènes bactériens potentiellement impliqués dans l'oxydation et la réduction ont été mis en évidence, avec une réduction importante dans les échantillons immergés.

Ces différentes formes de Sb peuvent également impacter les communautés bactériennes du milieu récepteur. Le séquençage des amplicons du gène codant l'ARNr 16S (approche méta-taxonomique) a ainsi démontré que l'Sb pouvait modifier la diversité et la structure des communautés microbiennes dans l'eau, les sédiments et les sols (références dans He et al., 2019). Ces modifications traduisent un enrichissement en phyla/genres bactériens résistants à l'Sb et/ou l'As, et à l'inverse une inhibition d'autres microorganismes supposés plus sensibles. Ainsi, une augmentation de l'abondance de genres bactériens principalement affiliés au phylum des *Proteobacteria* (Sun et al., 2016 & 2019) et *Actinobacteria* (Chen et al., 2022) a été observée dans les eaux et les sédiments de rivières contaminés par As et/ou Sb. Les taxons microbiens enrichis constitueraient un « *core genera* » ou empreinte génétique, traduisant une exposition des microorganismes à des concentrations toxiques en Sb et/ou As (Luo et al., 2014 ; Li et al., 2015; Sun et al., 2016 & 2017). La toxicité de l'Sb dépendrait non seulement de sa concentration, mais également de sa spéciation. Dans des échantillons de sol, Sb(III) diminue les indices de diversité bactérienne et les abondances de bactéries spécifiques (montré au niveau du phylum), alors que Sb(V) a comparativement peu d'effet (Wang et al., 2021).

Dans le bassin de rétention de Bréthencourt (Yvelines) où des changements de spéciation en Sb ont été observés, l'objectif de cette action est d'approfondir l'impact potentiel de cette contamination sur la diversité des communautés bactériennes totales et métaboliquement actives. Les taxons identifiés seront analysés en fonction de leur capacité à pouvoir intervenir dans les changements de spéciation (oxydation vs réduction) ou à posséder des mécanismes conférant une résistance à Sb. Ce travail s'appuie sur des expertises en chimie (quantification, spéciation de l'antimoine et analyse des phases porteuses) et microbiologie (approche méta-taxonomique) et s'intègre également dans le cadre du doctorat de Maëva Philippe (2019-2022) et Claire Da Costa (2020-2023).

1. Sites d'étude et approches méthodologiques

1.1 Présentation du site d'étude et échantillonnage

Le site d'étude correspond au bassin de rétention autoroutier localisé à Bréthencourt. La présentation du site et les conditions de prélèvements ont déjà été décrites dans un rapport PIREN-Seine 2021 (Axe 5, Philippe et al., 2021).

1.2 Extraction des acides nucléiques (ADN et ARN).

Les acides désoxyribonucléiques (ADN) et ribonucléiques (ARN) ont été extraits, à partir de cinq échantillons de sédiments prélevés dans le bassin rural récent de Bréthencourt à proximité de l'autoroute A10 (cf. rapport PIREN-Seine 2021, Philippe et al., 2021 ; Figure 1), afin de respectivement caractériser les communautés totales et métaboliquement actives. A l'issue du prélèvement dans le bassin de rétention, les échantillons ont été conservés à 4°C durant le transport et rapidement stockés à -80°C afin d'éviter la dégradation des ARN. L'ADN isolé de microorganismes d'échantillons environnementaux ne peut pas différencier la fraction vivante et la fraction morte d'un microbiome, car cet ADN persiste pendant des périodes plus longues que l'ARN, par exemple dans les sols, où l'ADN extracellulaire des organismes morts peut persister pendant des années (Carini et al., 2016). En raison de sa moindre stabilité, l'ARN ribosomal (ARNr)

est donc largement utilisé pour caractériser la composition phylogénétique des membres potentiellement actifs des communautés microbiennes (Blazewicz et al., 2013).

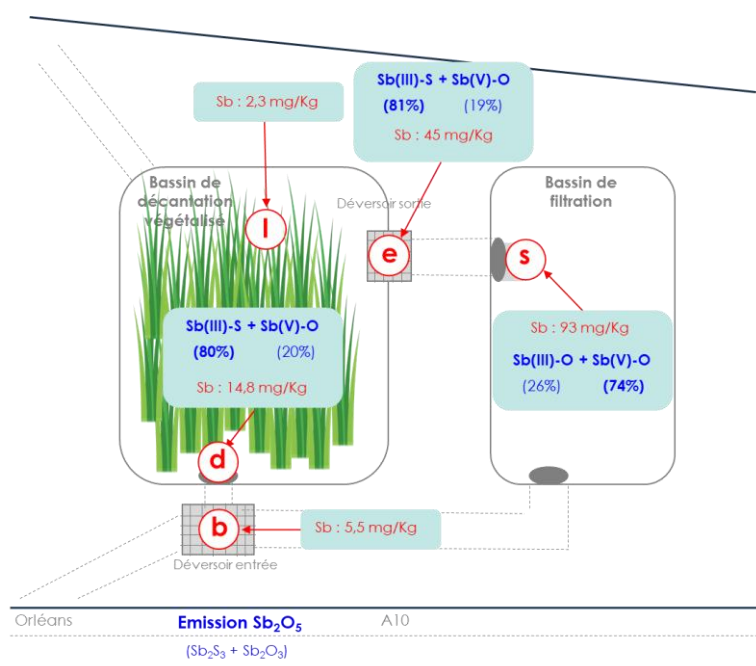


Figure 1 : Evolution des concentrations et de la spéciation en Sb le long du bassin de rétention de Bréthencourt. Identification des échantillons : b = S-DBSI-1A10; d = S-DBI-1A10; l = S-DBM-1A10; e = S-DBSO-1A10; s = S-FBPI-1A10. Figure modifiée à partir du rapport PIREN-Seine 2021 (Philippe et al., 2021).

Les acides nucléiques (ADN et ARN) ont été extraits (triplicata) à partir de 5 g de sédiment à l'aide des kits « RNeasy PowerSoil Total RNA Kit » et « DNA Elution Kit » (Qiagen). Ces kits permettent d'extraire conjointement les ADN et ARN à partir du même échantillon en utilisant une colonne JetStar Mini (Qiagen) et des tampons d'éluion distincts pour les différents acides nucléiques. Un travail d'optimisation de cette technique a toutefois été réalisé, car des inversions de phases ont pu être observées lors du traitement au phénol/chloroforme en raison de la présence probable d'hydrocarbures dans les échantillons (phase aqueuse). Un traitement supplémentaire par un mélange de deux ribonucléases de type A (RNase A/T1 Mix, Invitrogen™) a ainsi permis d'éliminer les ARN contaminants qui sont co-extraits avec les ADN. Les ADN et ARN extraits à l'aide de ce kit ont été utilisés pour l'approche de méta-taxonomique afin de comparer les communautés totales et actives sur les mêmes extractions d'acides nucléiques.

La concentration et la pureté des ADN et ARN ont été déterminées par spectrophotométrie (Nanodrop™ 2000/2000c). Afin d'éviter toute dégradation ultérieure, les ARN ont été stockés à -80°C. Il n'a toutefois pas été possible de réaliser l'extraction des ARN à partir de l'échantillon S-DBSI-1A10 en raison de la granulométrie (sédiments très grossiers (diam. < 10 mm) et bitume).

1.3 Amplification PCR

La quantification par qPCR des gènes impliqués dans l'oxydation (*aioA*) /réduction (*arrA*) des formes de Sb, ainsi que la détection de ceux codant des pompes à efflux conférant aux bactéries une résistance à Sb et As (*arsB*, *acr3*), ont été réalisées selon un protocole préalablement décrit dans le rapport PIREN-Seine de 2021 (Philippe et al., 2021).

1.4 Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Afin d'étudier la diversité des communautés microbiennes métaboliquement actives, l'ADN complémentaire (ou ADNc) a été synthétisé à partir des ARN. Préalablement à cette étape, la fraction d'ADN génomique pouvant contaminer les ARN extraits est éliminée par une désoxyribonucléase (DNase) recombinante (ezDNase, Invitrogen™). Cette enzyme est ensuite désactivée par traitement thermique à 55 °C pendant 2 min en présence d'un agent réducteur (DTT, 10 mM). A partir des ARN ainsi purifiés, une amplification PCR ciblant les gènes codant l'ARNr 16S (amorces ciblant la région V3-V4 de l'ARNr 16S ; Lui et al. 2007 et Andersson et al. 2008) est systématiquement réalisée afin de s'assurer de l'absence d'ADN

résiduel contaminant (et donc de l'efficacité du traitement par la DNase) qui pourrait fausser les interprétations ultérieures.

En l'absence d'amplification du gène cible par PCR, la transcription inverse est alors réalisée à partir de 20 µl d'ARN purifiés (658,9 à 4477,1 ng) en utilisant une transcriptase inverse (SuperScript IV Reverse Transcriptase, Invitrogen™) et des amorces constituées d'hexamères aléatoires (Random primers, Invitrogen™), tout en respectant les conditions préconisées par le fournisseur. L'efficacité de cette étape est également contrôlée par une amplification PCR ciblant à nouveau les gènes codant les ARNr 16S (Lui et al. 2007 et Andersson et al. 2008) qui doit permettre cette fois-ci l'amplification de fragments de 460 pb.

1.5 Séquençage haut débit

Une approche de séquençage haut-débit (Illumina) basée sur l'amplification d'un fragment du gène V3-V4 (amorces 341F/785R, Klindworth et al., 2013) codant l'ARNr 16S a permis d'évaluer les modifications de la diversité taxonomique et de la composition des communautés microbiennes des cinq échantillons prélevés le long du continuum route-bassin étudié.

Les amplicons résultant de différents échantillons ont été mélangés en concentrations égales et purifiés à l'aide de billes Agencourt Ampure (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). Les amplicons combinés, regroupés et purifiés ont ensuite été utilisés pour préparer une banque d'ADN à l'aide du kit « TruSeq DNA LT Sample Prep Kit (Illumina, États-Unis) » en suivant les instructions du fabricant. Le séquençage a été effectué à l'aide d'une plateforme MiSeq (Illumina, USA) par séquençage en paires « Paired end » par Molecular Research LP (Mr DNA, Shallowater, TX, USA).

1.6 Traitement bio-informatique et statistique des données

Après séquençage, les séquences de faible qualité ont été éliminées à l'aide de la fonction « *filterAndTrim* ». Après un contrôle de la qualité et de la fusion des séquences sens (R1) et antisens (R2), les *Amplicon Sequence Variants* (ASV) sont définis et les chimères sont détectées avec la fonction « *removeBimeraDenovo* » de la librairie *dada2* puis éliminées. Une fois les séquences biologiques de haute qualité obtenues, la taxonomie est affiliée en utilisant la base de données de référence SILVA rRNA (v.138). La relation entre la profondeur de séquençage et le nombre de taxons bactériens observés (ASV) a été tracée à l'aide de la fonction « *rarecurve* » du package *vegan* (v.2.5.7) (Figure 1). La diversité alpha taxonomique a été évaluée en estimant le nombre d'ASV observés (Observed), et l'indice de Shannon-Weaver (H') en utilisant la fonction « *estimate_richness* » du package *phyloseq* (v.1.32.0). Une analyse PCoA a été utilisée pour comparer les profils en ASV entre les différents échantillons, suivie d'une PERMANOVA (ANOVA permutationnelle).

2. Résultats

2.1 Evolution des concentrations et de la spéciation de Sb

Des variations de concentration en Sb sont observées entre les prélèvements menés sur l'ensemble du bassin (données présentées sous forme de facteurs d'enrichissement dans le rapport 2021, Philippe et al., 2021). Au niveau du déversoir d'entrée, la concentration en Sb dans les sédiments est plus faible (5,5 mg.kg⁻¹, échantillon b : S-DBSI-1A10), puis on observe une concentration plus élevée à l'entrée du bassin végétalisé (14,8 mg.kg⁻¹, échantillon d : S-DBI-1A10), ainsi qu'au niveau du déversoir de sortie correspondant à la transition entre deux bassins (45 mg.kg⁻¹, échantillon e : S-DBSO-1A10) et dans le bassin de filtration (93 mg.kg⁻¹, échantillon s : S-FBPI-1A10). Dans le bassin de décantation végétalisé, la concentration en antimoine dans les sédiments prélevés à proximité des roseaux est bien inférieure (2,3 mg.kg⁻¹, échantillon l : S-DBM-1A10) à celle observée au niveau de l'exutoire (Figure 1).

Parmi ces échantillons, s, e et d présentent les plus fortes concentrations en Sb. Pour ces trois échantillons, la spéciation et l'environnement moléculaire du Sb ont été déterminés par spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES) sous rayonnement synchrotron sur la ligne SAMBA du synchrotron SOLEIL. A l'entrée comme à l'exutoire du bassin végétalisé (échantillons e : S-DBSO-1A10 et d : S-DBI-1A10), Sb est majoritairement sous forme réduite Sb(III) associé au ligand soufre (Sb(III)-S, respectivement 81 et 80%), accompagné de formes antimoniate Sb(V) associées au ligand oxygène (Sb(V)-O, respectivement 19 et 20%). A l'entrée du bassin de filtration (échantillon d), l'antimoine est majoritairement sous forme antimoniate Sb(V) (Sb(V)-O, 74%) et exclusivement associé à un ligand oxygène avec une contribution additionnelle d'antimonite (Sb(III)-O, 26%).

2.2 Diversité des communautés microbiennes totales et métaboliquement actives dans le bassin de rétention

2.2.1 Evolution du nombre de *reads* et des indices diversité

A l'issue du séquençage, 3 004 101 séquences brutes ont été obtenues pour l'ensemble des échantillons. Les séquences ont ensuite été filtrées en fonction de critères de qualité et les séquences sens (R1) et antisens (R2) ont été fusionnées. Les séquences chimériques (7,38%) ont été éliminées. A la suite de l'assignation taxonomique, un total de 729 045 *reads* de haute qualité ont été conservés et assignés à 19 240 variants de séquence d'amplicon (Amplicon Sequence Variant, ASV) à partir des banques réalisées pour les communautés bactériennes totales (5 échantillons, Tableau 1). Pour les communautés actives, 401 695 *reads* ont été assignés à 18 491 ASV (4 échantillons ; d, S-DBI-1A10 ; e, S-DBSO-1A10 ; l, S-DBM-1A10 et s, S-FBPI-1A10).

Tableau 1 : Evolution du nombre de *reads* et ASV dans les 5 échantillons prélevés dans le bassin de rétention autoroutier.

Echantillons	Communautés totales (ADN)		Communautés actives (ARN)	
	Nombre de <i>reads</i>	Nombre d'ASV	Nombre de <i>reads</i>	Nombre d'ASV
<i>S-DBSI-1A10</i>	185 634	61 878	n.a.	n.a.
<i>S-DBI-1A10</i>	132 616	44 205	87 058	29 019
<i>S-DBM-1A10</i>	130 570	43 523	97 252	32 417
<i>S-DBSO-1A10</i>	146 494	48 831	95 364	31 788
<i>S-FBPI-1A10</i>	133 731	44 577	122 021	40 674
Total échantillons ⁽¹⁾	729 045	19 240	401 1695	18 491

⁽¹⁾ 4 échantillons seulement ont été analysés pour les communautés actives ; n.a., non analysé

Les courbes de raréfaction ont été estimées afin de vérifier l'adéquation entre l'estimation de la richesse microbienne dans chaque échantillon (nombre d'ASV) et la profondeur de séquençage obtenue (Figure 2). Pour les communautés totales (ADN), les courbes de raréfaction calculées montrent que le taux de couverture (ou couverture de séquençage) est correct sans qu'une asymptote soit obtenue, à l'exception de l'échantillon d pour lequel nous avons une excellente estimation de la diversité. Concernant les communautés actives (ARN), les courbes de raréfaction indiquent que l'échantillonnage des communautés microbiennes n'a pas été exhaustif (Figure 2B).

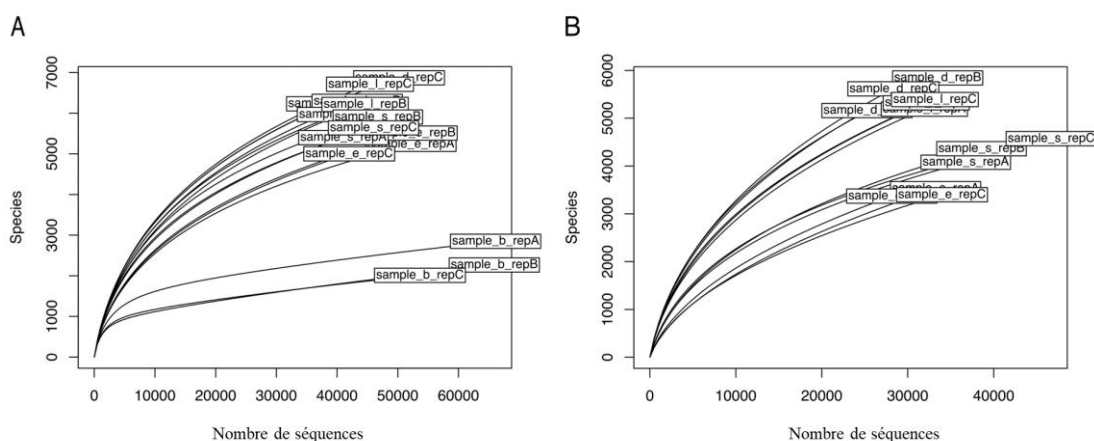


Figure 2 : Courbes de raréfaction montrant la relation entre le nombre de séquences analysées correspondant à l'ARNr 16S V3-V4 et le nombre d'ASV identifiés au sein des communautés (A) microbiennes totales (5 échantillons : b, d, e, l et s) et (B) métaboliquement actives (d, e, l et s). b = *S-DBSI-1A10*; d = *S-DBI-1A10*; l = *S-DBM-1A10*; e = *S-DBSO-1A10*; s = *S-FBPI-1A10*. La nomenclature utilisée pour désigner les échantillons est la suivante : *sample_identification de l'échantillon_identification du réplicat (repA, repB ou repC)*.

Deux indices de diversité (diversité alpha) ont été utilisés pour suivre les modifications de diversité au sein de la communauté bactérienne sur l'ensemble du bassin de rétention : la richesse (Observed) qui correspond simplement au nombre d'ASV identifiés et l'indice de Shannon qui évalue à la fois la richesse et l'équitabilité (régularité de la distribution des ASV).

La richesse (Observed) est la plus faible pour l'échantillon b, S-DBSI-1A10, à l'entrée du bassin de rétention puis augmente de plus d'un facteur 2 au sein des autres échantillons (Figure 3A). Ceci peut s'expliquer par la composition de l'échantillon b, S-DBSI-1A10, qui est constitué de sédiments grossiers et de morceaux de bitume, donc moins susceptible d'être colonisé par des microorganismes, alors que les autres échantillons sont constitués de sédiments plus fins. Pour chacun des échantillons, les richesses obtenues à partir des communautés totales sont systématiquement supérieures à celles des communautés actives, démontrant que les approches de méta-taxonomique ciblant l'ADN prennent en compte des bactéries mortes, cellules intègres, mais en phase de dormance ainsi que l'ADN de bactéries lysées (ADN nu ou environnemental). La diversité microbienne, estimée à l'aide de l'indice de Shannon, varie également au sein des différents échantillons du bassin de rétention.

En complément, les indices de Shannon montrent que les ASV sont distribués de manière homogène au sein des communautés bactériennes totale et active des échantillons d (S-DBI-1A10) et s (S-DBM-1A10) en complément (Figure 3B). A l'inverse, la présence d'ASV dominants est observée au sein de la communauté bactérienne active pour les échantillons e (S-DBSO-1A10) et s (S-FBPI-1A10).

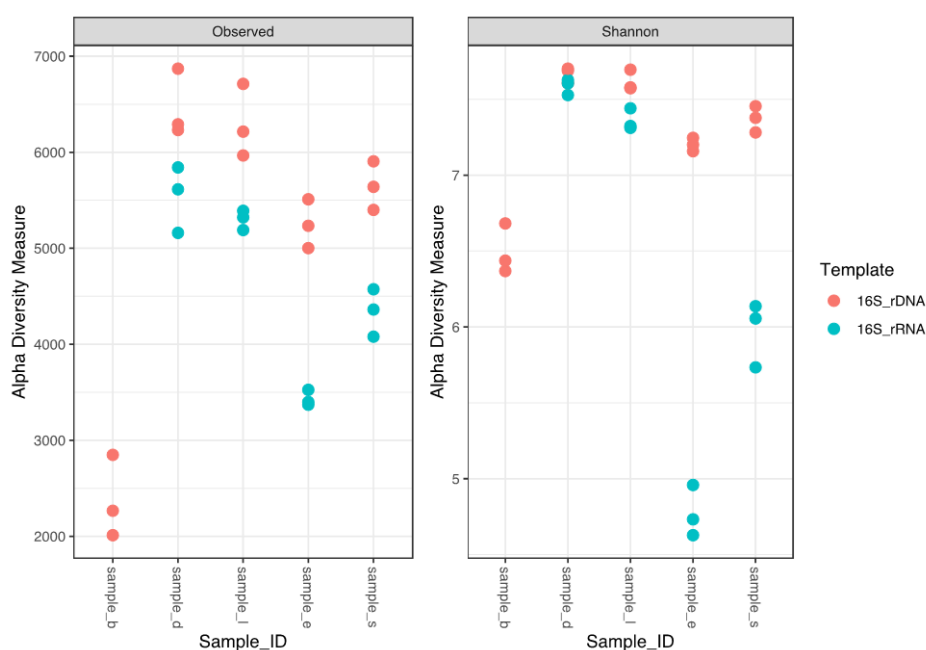


Figure 3 : Evolution des indices de diversité (alpha), représentés par la richesse (Observed) et l'indice de Shannon-Weaver (H'), des communautés microbiennes actives (symbole bleu, 16S_rRNA) et totales (symbole rouge, 16S_rDNA) des différents échantillons de sédiments prélevés sur l'ensemble du bassin de rétention de Bréthencourt. Identification des échantillons : b = S-DBSI-1A10; d = S-DBI-1A10; l = S-DBM-1A10; e = S-DBSO-1A10; s = S-FBPI-1A10.

2.2.2 Structure et composition des communautés microbiennes (totales vs métaboliquement actives)

Comparaison des structures des communautés bactériennes totales et actives

Afin de comparer la structure de la communauté bactérienne au sein des différents échantillons, une analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur une matrice de distances de Bray-Curtis a été réalisée. Les composantes principales PCo1 et PCo2 expliquent respectivement 26,4 % et 16,5 % de la variation totale de la communauté bactérienne (Figure 4). Quel que soit l'échantillon, les réplicats techniques sont regroupés, indiquant une bonne reproductibilité des procédures d'extraction et de séquençage. Les profils d'ASV obtenus à partir des communautés totales et actives sont regroupés par échantillon, ce qui semble indiquer qu'il n'y a pas de variation significative entre les deux communautés à l'échelle de l'ASV. Cette observation a été confirmée par une PERMANOVA (p-value > 0,1).

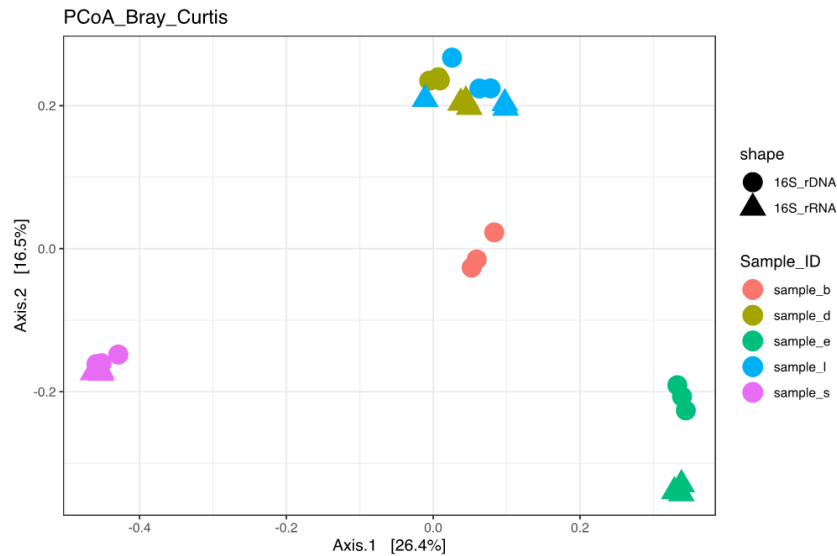


Figure 4 : Diagramme d'ordination montrant le regroupement des échantillons de sédiments (désignés par différentes couleurs) en fonction de la structure des communautés microbiennes. Les caractères ronds et triangles représentent respectivement les communautés microbiennes totales et métaboliquement actives des échantillons. Les composantes principales 1 et 2 expliquent respectivement 26,4 et 16,5 % de la variation de la composition des communautés microbiennes. Identification des échantillons: b = S-DBSI-1A10; d = S-DBI-1A10; l = S-DBM-1A10; e = S-DBSO-1A10; s = S-FBPI-1A10.

Les communautés bactériennes totales et métaboliquement actives ont 13 496 ASV en commun (correspondant respectivement à 97,9 % et 93,1 % des reads de chaque communauté, Figure 5). Un très faible nombre d'ASV (entre 2,1 et 6,9 %, Figure 5) leur sont spécifiques.

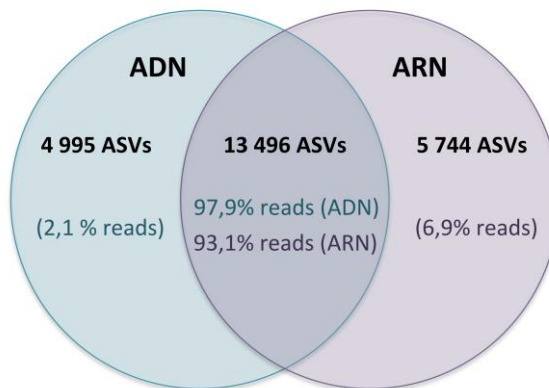


Figure 5 : Diagramme de Venn basé sur la présence des ASV au sein des communautés bactériennes totales (ADN) et métaboliquement actives (ARN).

Composition des communautés bactériennes :

La comparaison des échantillons au sein du continuum montre que les communautés bactériennes sont bien différenciées, à l'exception des échantillons S-DBI-1A10 et S-DBM-1A10 prélevés dans le bassin végétalisé regroupés sur la PCoA (Figure 5). L'homogénéité des variances au sein des 5 échantillons a été validée (test de Marti Anderson, p-value > 0,001), puis une analyse multivariée des variances par permutations (PERMANOVA) a confirmé que la structure des communautés microbiennes était significativement différente (p-value < 0,001) selon les échantillons analysés.

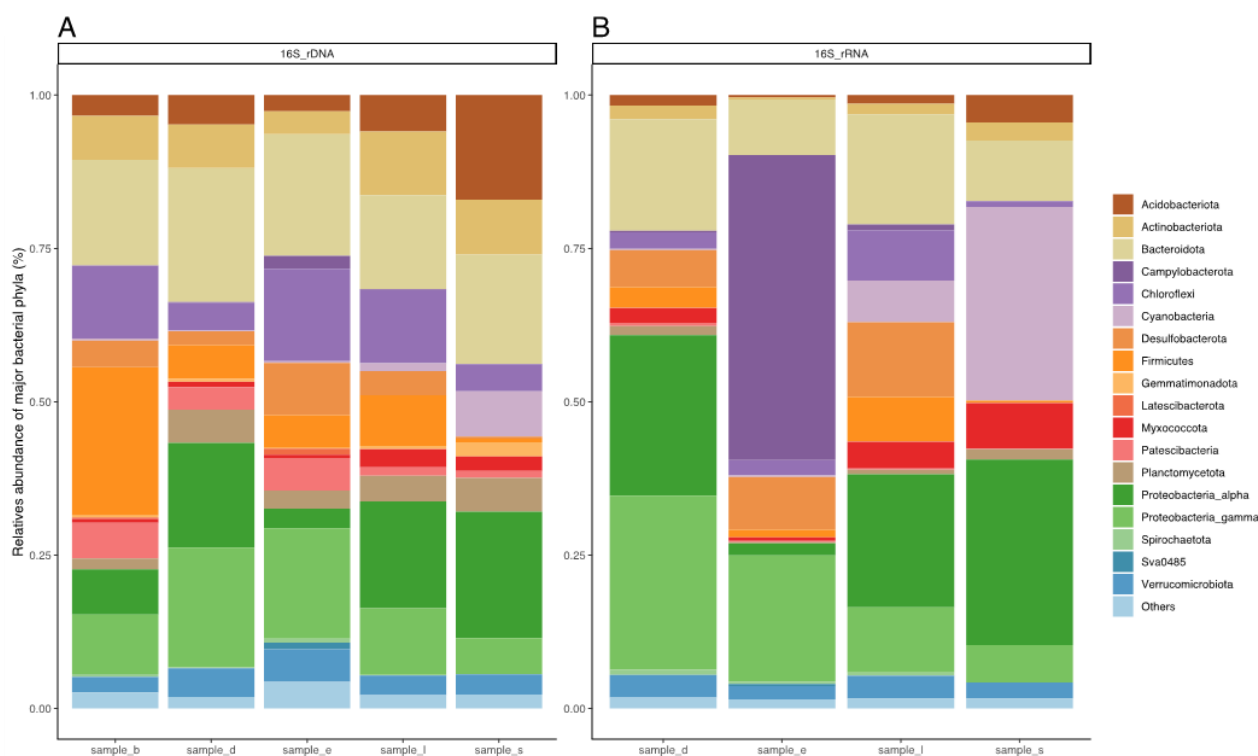


Figure 6 : Abondance relative des phyla majoritaires au sein des communautés totales (A, 16S_rDNA) et métaboliquement actives (B, 16S_rRNA) sur l'ensemble du bassin de rétention de Bréthencourt. La composition du phylum des *Proteobacteria* a été détaillée à l'échelle de la classe. Identification des échantillons : b = S-DBSI-1A10; d = S-DBI-1A10; l = S-DBM-1A10; e = S-DBSO-1A10; s = S-FBPI-1A10.

A la suite de l'assignation taxonomique des ASV, 18 phyla majoritaires ont été définis au sein des communautés totales sur la base d'une abondance relative supérieure à 1% dans au moins un des échantillons situés le long du bassin de rétention de Bréthencourt (Figure 6). Les phyla *Bacteroidota* et *Proteobacteria* (classes α et γ) sont majoritairement identifiés, mais des variations de la composition de la communauté bactérienne totale sont toutefois observées entre les 5 échantillons (Figure 6A) :

- A l'entrée du déversoir, l'échantillon b (S-DBSI-1A10) est caractérisé par une augmentation du nombre d'ASV affiliés aux Firmicutes ($24,21 \pm 1,30$ %) par rapport aux autres échantillons ($8,25 \pm 4,34$ %) (Kruskal-Wallis, p-value < 0,01).
- Dans les sédiments du bassin de décantation végétalisé, un enrichissement significatif en ASV affiliés au phylum *Actinobacteriota* ($10,34 \pm 1,23$ %) a été observé (échantillon l, S-DBM-1A10), comparativement aux autres échantillons ($8,97 \pm 0,78$ %) (Kruskal-Wallis, p-value < 0,01).
- A la sortie du bassin de décantation, l'échantillon e (S-DBSO-1A10) présente un enrichissement significatif des ASV affiliés aux phyla des *Campylobacterota* ($2,11 \pm 0,76$ %) et *Chloroflexi* ($15,09 \pm 1,39$ %), comparativement aux autres échantillons où leurs abondances sont respectivement inférieures à $0,16 \pm 0,02$ % et $11,93 \pm 1,74$ % (Kruskal-Wallis, p-value < 0,01).
- A l'entrée du bassin de filtration, le phylum *Acidobacteriota* faiblement représenté dans l'ensemble des échantillons ($5,95 \pm 2,18$ %) présente une abondance relative significativement plus élevée ($17,02 \pm 1,12$ %) (Kruskal-Wallis, p-value < 0,01) dans l'échantillon s (S-FBPI-1A10).

Concernant les communautés métaboliquement actives (Figure 6B), les phyla *Bacteroidota* et *Proteobacteria* (classes α et γ) ne sont plus systématiquement majoritaires au sein des deux communautés à l'exception de l'échantillon à l'entrée du déversoir (échantillon d, S-DBI-1A10). Au sein de ce continuum, d'autres modifications au niveau des taxons métaboliquement actifs sont observées :

- Dans les sédiments du bassin de décantation végétalisé (échantillon l, S-DBM-1A10), une augmentation du nombre d'ASV affiliés au phylum *Desulfobacterota* a été observée au sein de la communauté active ($12,22 \pm 4,60$ %) comparativement à la communauté totale ($3,97 \pm 1,16$ %). A l'inverse, le phylum *Actinobacteriota* présente une abondance relative plus importante dans la communauté totale ($10,34 \pm 1,23$ %).

- A la sortie du bassin de décantation (échantillon e, S-DBSO-1A10), le phylum *Campylobacterota* est majoritaire au sein de la communauté active (49,72 ± 2,80 %) alors qu'il ne représente que 2,11 ± 0,76 % des ASV identifiés dans la communauté totale.
- A l'entrée du bassin de filtration (échantillon s, S-FBPI-1A10), les *α-Proteobacteria* (30,27 ± 2,40 %) et les *Cyanobacteria* (31,50 ± 4,24 %) sont les phyla majoritaires de la communauté active où ils représentent plus de 60% des ASV.

2.3 Concentration et spéciation en Sb, diversité bactérienne et occurrence des gènes impliqués dans la spéciation ou résistance de l'Sb

Les résultats correspondant à la quantification des gènes codant des enzymes impliquées dans la réduction (*arrAB*) et oxydation (*aioA*) de l'Sb ainsi que ceux conférant une résistance à Sb et l'arsenic (As) (pompe à efflux) ont été présentés dans le rapport 2021 (Philippe et al., 2021). Les résultats suggéraient que le potentiel d'oxydation (*aioA*) pouvait être présent en tous points du bassin de Bréthencourt, alors que le processus de réduction (*arrAB*) était favorisé dans les sédiments présentant des conditions plus réductrices. Il n'avait cependant pas été possible de détecter deux autres gènes (*anoA* et *anrA*) impliqués respectivement dans l'oxydation et la réduction de l'antimoine en raison de la forte spécificité des amorces (ciblant le gène de certains taxons uniquement). Un travail d'optimisation des amorces, en utilisant la séquence du gène *anoA*, séquencés à partir d'un plus grand nombre d'espèces, a donc été réalisé. Les résultats sont en cours de validation (Da Costa, en préparation) à partir des sédiments de Metaleurop, d'une archive sédimentaire (Martot, projet EC2CO Avant-Seine) et ceux de cette étude. Les gènes conférant la résistance à Sb et As (*arsB* et *acr3*) avaient été détectés dans la totalité des échantillons sans toutefois pouvoir être quantifiés par qPCR. Une approche permettant de quantifier ces deux gènes a été développée et est également en cours de validation.

Pour chaque échantillon (à l'exception du déversoir d'entrée, échantillon b : S-DBSI-1A10), la comparaison de l'abondance des taxons au sein des communautés bactériennes totales et actives permet d'identifier les taxons les plus représentés au sein de la communauté active (Figure 7). A titre d'exemple, à l'entrée du bassin de décantation (échantillon d : S-DBI-1A10), le genre *Dechloromonas* est un taxon représentatif au sein de la communauté active. Une analyse croisée des résultats de spéciation/quantification de Sb, des quantifications de gènes et de la composition des communautés microbiennes le long du bassin de rétention a donc été effectuée.

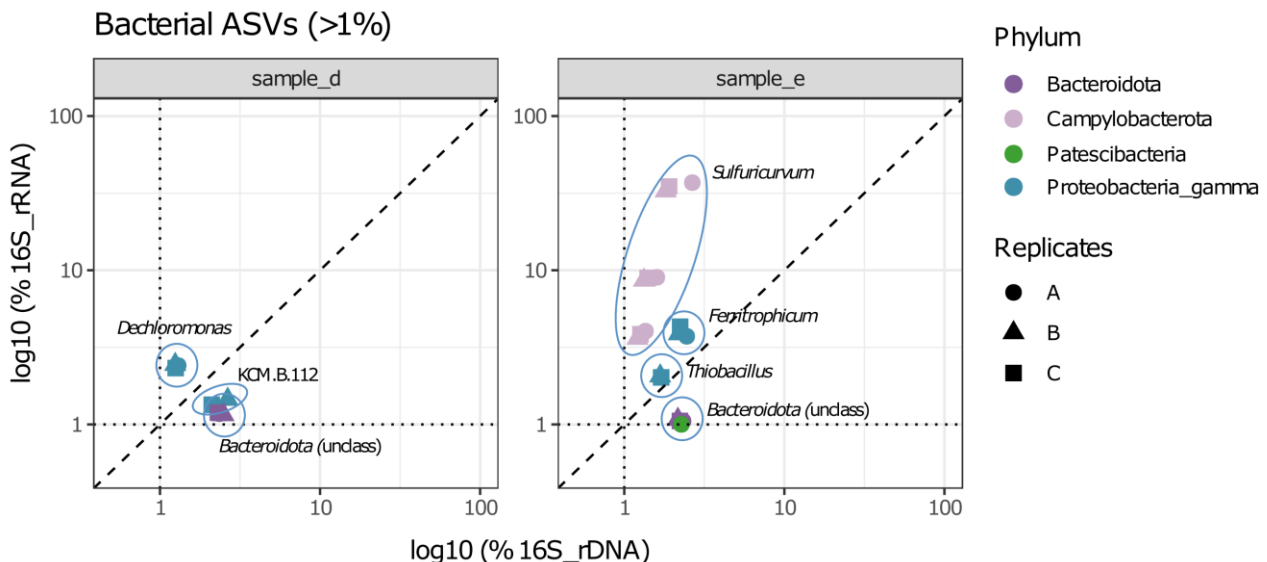


Figure 7 : Comparaison de l'abondance des taxons (ASV) au sein des communautés totales et actives pour les échantillons d = S-DBI-1A10 et e = S-DBSO-1A10. Seuls les ASV dont l'abondance relative est supérieure à 1% ont été pris en compte. Les résultats correspondent à l'analyse de trois réplicats qui sont représentés par trois symboles différents.

A l'entrée du bassin de décantation (échantillon d : S-DBI-1A10) où Sb(III) est majoritaire, les genres bactériens actifs identifiés appartiennent aux genres *Hydrogenophaga* et *Bradyrhizobium*, dont certains

membres possèdent le gène *aioA* (Terry et al., 2015; Li et al., 2021) et sont donc potentiellement capables d'effectuer l'oxydation de Sb(III). Le genre *Dechloromonas* est quant à lui capable d'effectuer la réduction de l'Sb(V) (Yang et al. 2020) (Figure 8).

Dans le bassin de décantation (échantillon l : S-DBM-1A10), le genre *Bradyrhizobium* impliqué dans l'oxydation de Sb(III) est également identifié (Li et al., 2021) ainsi que le genre *Citrifermentans* qui est un genre résistant à de nombreux métaux (Otoni et al., 2022). Dans le déversoir de sortie (échantillon e : S-DBSO-1A10) où Sb(III) est majoritaire (Figure 8), les microorganismes actifs principaux appartiennent au genre *Thiobacillus*, dont certaines espèces sont capables d'oxyder Sb(III) (Torma et al. 1977). Le genre *Sulfuricurvum* (phylum *Campylobacterota*) est également identifié. Bien que ne possédant pas les gènes *aioA* et *arrA*, certaines espèces de ce genre possèdent des gènes de résistance communs à l'arsenic et l'antimoine tel que le gène *arsB* (efflux Sb(III)) ainsi que le gène *arsC*, intervenant dans la réduction de l'As et donc potentiellement impliqué dans la réduction de Sb (III) (Handley et al., 2014; Li et al., 2019). A l'entrée du bassin de filtration, le genre *Bradyrhizobium* est à nouveau majoritaire au sein des communautés actives, ainsi que le genre *Skermanella* dont certaines espèces ont été isolées à partir d'échantillons de sols à proximité de mines de charbon contaminés par l'antimoine (Luo et al., 2012).

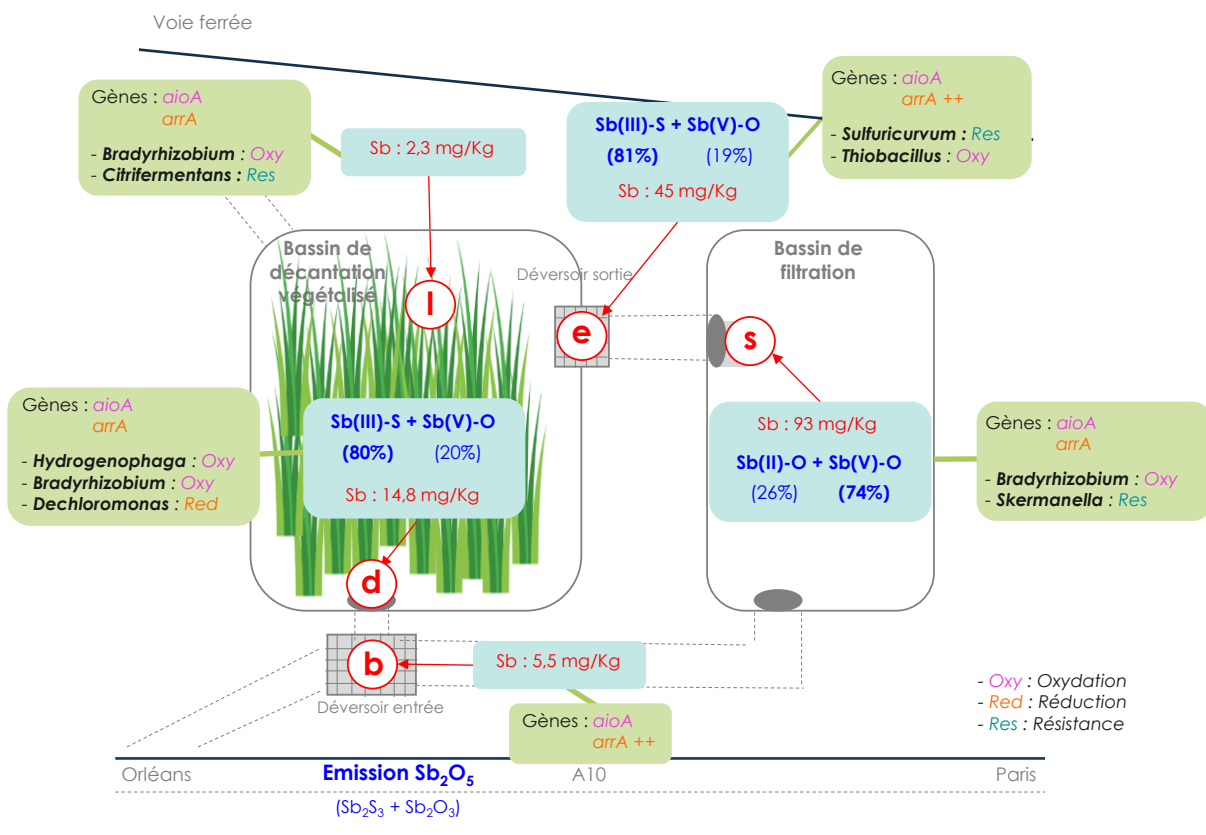


Figure 8 : Identification de taxons bactériens métaboliquement actifs potentiellement impliqués dans le changement de spéciation ou la résistance à Sb le long du continuum étudié. Leur présence est comparée à l'occurrence de gènes bactériens impliqués dans l'oxydation et réduction de l'antimoine ou son efflux (conférant ainsi la résistance à ce métalloïde), ainsi que la spéciation (et phases porteuses) et les concentrations totales en Sb. Identification des échantillons : b = S-DBSI-1A10; d = S-DBI-1A10; l = S-DBM-1A10; e = S-DBSO-1A10; s = S-FBPI-1A10.

Conclusion et perspectives

Une analyse de la diversité des communautés microbiennes totales et métaboliquement actives a été effectuée au sein d'un bassin de rétention autoroutier contaminé par Sb. L'approche méta-taxonomique montre que plus de 90 % des ASV identifiés sont communs aux deux communautés. Les communautés bactériennes sont bien différenciées au sein des échantillons prélevés le long du continuum route-bassin, mais il n'y a pas de variation significative entre les communautés totales et actives.

Les communautés microbiennes totales sont majoritairement représentées par des *Bacteroidota* et *Proteobacteria* (classes α - et γ -) qui ne constituent pas nécessairement les taxons métaboliquement actifs majoritaires. La comparaison des communautés totales et actives a permis d'identifier des taxons métaboliquement actifs potentiellement impliqués dans les processus de réduction (*Dechloromonas*) et oxydation (*Hydrogenophaga*, *Thiobacillus*, *Bradyrhizobium*) de Sb et qui pourraient être responsables des changements de spéciation et de ligands observés entre les échantillons au sein du continuum route-bassin. De plus, des genres bactériens, connus pour posséder des mécanismes de résistance à Sb et/ou à l'arsenic (As), ont également pu être identifiés au sein des communautés actives. L'approche de séquençage haut-débit basée sur l'amplification de l'ARNr 16S étant semi-quantitative, il sera nécessaire de confirmer l'abondance de ces taxons/ASV par une approche de qPCR ciblant spécifiquement ces genres.

Les mécanismes de changement de spéciation et de ligand de Sb observés le long du continuum route-bassins peuvent être dus à des processus biotiques et/ou abiotiques. Afin de mieux comprendre la contribution des différents taxons identifiés dans cette étude, une étude transdisciplinaire basée sur une expérience en microcosmes en conditions contrôlées (oxique/anoxique, dopage avec des taxons ciblés) sera mise en œuvre.

Bibliographie

- Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., and Engstrand, L. (2008) Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLOS ONE* 3: e2836.
- Ayrault S., Priadi C. R., Pape P. L. and Bonté P. (2013) Occurrence, Sources and Pathways of Antimony and Silver in an Urban Catchment. In *Urban Environment* (eds. S. Rauch, G. Morrison, S. Norra, and N. Schleicher). Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 425–435.
- Blazewicz, S.J., Barnard, R.L., Daly, R.A., and Firestone, M.K. (2013) Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *ISME J* 7: 2061–2068.
- Carini, P., Marsden, P.J., Leff, J.W., Morgan, E.E., Strickland, M.S., and Fierer, N. (2016) Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nat Microbiol* 2: 1–6.
- Chen, X., Wang, J., Pan, C., Feng, L., Guo, Q., Chen, S., and Xie, S. (2022) Metagenomic analysis reveals the response of microbial community in river sediment to accidental antimony contamination. *Science of The Total Environment* 813: 152484.
- Handley, K. M., Bartels, D., O'Loughlin, E. J., Williams, K. H., Trimble, W. L., Skinner, K., et al. (2014). The complete genome sequence for putative H₂-and S-oxidizer Candidatus *Sulfuricurvum* sp., assembled de novo from an aquifer-derived metagenome. *Environmental microbiology*, 16(11), 3443-3462.
- He, M., Wang, N., Long, X., Zhang, C., Ma, C., Zhong, Q., et al. (2019) Antimony speciation in the environment: Recent advances in understanding the biogeochemical processes and ecological effects. *Journal of Environmental Sciences* 75: 14–39.
- Hjortenkrans, D., Bergbäck, B., and Häggerud, A. (2006) New Metal Emission Patterns in Road Traffic Environments. *Environ Monit Assess* 117: 85–98.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41: e1.
- Li, J., Wang, Q., Li, M., Yang, B., Shi, M., Guo, W., et al. (2015) Proteomics and Genetics for Identification

of a Bacterial Antimonite Oxidase in *Agrobacterium tumefaciens*. Environ Sci Technol 49: 5980–5989.

Li, X., Yang, Y., Zeng, X., Wang, J., Jin, H., Sheng, Z., and Yan, J. (2019) Metagenome-Assembled Genome Sequence of *Sulfuricurvum* sp. Strain IAE1, Isolated from a 4-Chlorophenol-Degrading Consortium. Microbiol Resour Announc 8: e00296-19.

Li, Y., Zhang, M., Xu, R., Lin, H., Sun, X., Xu, F., et al. (2021) Arsenic and antimony co-contamination influences on soil microbial community composition and functions: Relevance to arsenic resistance and carbon, nitrogen, and sulfur cycling. Environment International 153: 106522.

Liu, Z., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., and Knight, R. (2008) Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. Nucleic Acids Research 36: e120.

Luo, G., Shi, Z., Wang, H., and Wang, G. (2012) *Skermanella stibiirensistens* sp. nov., a highly antimony-resistant bacterium isolated from coal-mining soil, and emended description of the genus *Skermanella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62: 1271–1276.

Luo, J., Bai, Y., Liang, J., and Qu, J. (2014) Metagenomic Approach Reveals Variation of Microbes with Arsenic and Antimony Metabolism Genes from Highly Contaminated Soil. PLOS ONE 9: e108185.

Otoni, J.R., dos Santos Grignet, R., Barros, M.G.A., Bernal, S.P.F., Panatta, A.A.S., Lacerda-Júnior, G.V., et al. (2022) DNA Metabarcoding from Microbial Communities Recovered from Stream and Its Potential for Bioremediation Processes. Curr Microbiol 79: 70.

Philippe, M., Pape, P.L., Costa, C.D., Colin, Y., Berthe, T., Landrot, G., et al. (2021) L'antimoine, un polluant émergent dans les sols et rivières urbaines : Géochimie élémentaire, isotopique et spéciation sur le continuum route – bassins routiers, premières études sur la biogéochimie de Sb. 26.

Sun, W., Xiao, E., Dong, Y., Tang, S., Krumins, V., Ning, Z., et al. (2016) Profiling microbial community in a watershed heavily contaminated by an active antimony (Sb) mine in Southwest China. Science of The Total Environment 550: 297–308.

Sun, W., Xiao, E., Xiao, T., Krumins, V., Wang, Q., Häggblom, M., et al. (2017) Response of Soil Microbial Communities to Elevated Antimony and Arsenic Contamination Indicates the Relationship between the Innate Microbiota and Contaminant Fractions. Environ Sci Technol 51: 9165–9175.

Sun, X., Li, B., Han, F., Xiao, E., Xiao, T., and Sun, W. (2019) Impacts of Arsenic and Antimony Co-Contamination on Sedimentary Microbial Communities in Rivers with Different Pollution Gradients. Microb Ecol.

Terry, L.R., Kulp, T.R., Wiatrowski, H., Miller, L.G., and Oremland, R.S. (2015) Microbiological Oxidation of Antimony(III) with Oxygen or Nitrate by Bacteria Isolated from Contaminated Mine Sediments. Appl Environ Microbiol 81: 8478–8488.

Tian, H., Zhou, J., Zhu, C., Zhao, D., Gao, J., Hao, J., et al. (2014) A Comprehensive Global Inventory of Atmospheric Antimony Emissions from Anthropogenic Activities, 1995–2010. Environ Sci Technol 48: 10235–10241.

Torma, A.E. and Gabra, G.G. (1977) Oxidation of stibnite by *Thiobacillus ferrooxidans*. Antonie van Leeuwenhoek 43: 1–6.

Wang, A., He, M., Ouyang, W., Lin, C., and Liu, X. (2021) Effects of antimony (III/V) on microbial activities and bacterial community structure in soil. Science of The Total Environment 789: 148073.

Yang, Z., Hosokawa, H., Sadakane, T., Kuroda, M., Inoue, D., Nishikawa, H., and Ike, M. (2020) Isolation and Characterization of Facultative-Anaerobic Antimonite-Reducing Bacteria. Microorganisms 8: 1435.