MICROBIOMIQ

Approche multi-omiques pour la caractérisation du lien entre la biodiversité structurelle et l'activité microbienne dans l'évolution naturelle de la fonction photosynthétique et sa réponse au stress chimique au sein des communautés périphytiques

Métaprogramme BIOSEFAIR

Bilan de projet : 2021 – 2024

Mars 2025

Les communautés microbiennes périphytiques aquatiques sont des assemblages complexes de micro-organismes (algues, bactéries, champignons, cyanobactéries, protozoaires) qui constituent des biofilms plus ou moins attachés à des surfaces immergées (inertes ou vivantes) dans la plupart des écosystèmes aquatiques. Ces communautés jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes et le maintien des services écosystémiques (e.g. production primaire, cycles biogéochimiques).

Dans le contexte des changements globaux, un des enjeux majeurs pour la santé environnementale et humaine est de mieux comprendre la réponse de ces communautés à ces multiples pressions en termes d'acclimatation, d'adaptation et de résilience afin de pouvoir préserver les fonctions/services écosystémiques associés. En particulier, face à la

contamination chimique de ces écosystèmes, l'un des défis actuels est d'arriver à déterminer comment les fluctuations « naturelles » de la biodiversité structurelle et le fonctionnement microbien liées aux conditions environnementales modulent la réponse au stress chimique de ces communautés.

Les nouvelles méthodes d'analyse dites « omiques » et leur combinaison ouvrent de nouvelles perspectives en éco(toxico)logie microbienne pour répondre à ces déficits de connaissance.

MICROBIOMIQ avait pour objectif de mieux comprendre le lien entre l'activité microbienne (i.e. métabolome), la biodiversité structurelle (diversité des espèces et des gènes via la métagénomique) et la sensibilité au stress chimique de biofilms périphytiques en lien avec les changements « naturels » dans la composition et le fonctionnement de ces communautés dépendantes des conditions environnementales. En mettant en œuvre une approche combinant métagénomique et méta-métabolomique sur ces biofilms le projet se focalise sur la modulation de la photosynthèse qui est une fonction clef portée par ces communautés et qui est fortement impliquée dans les cycles biogéochimiques et la production primaire.

Plus spécifiquement MICROBIOMIQ vise à répondre aux questions suivantes :

Q1. *Quel est le lien entre les changements temporels de biodiversité, d'activité microbienne et de fonction photosynthétique au sein de communautés périphytiques aquatiques en condition naturelle ?*
Q2. *Quelle est la conséquence de ces changements naturels sur la sensibilité de ces communautés au stress chimique ?*
Q3. *Quel est le lien entre les changements structuraux et fonctionnels dans la modulation de l'activité photosynthétique par la pression chimique en conditions contrôlées ?*

Pour ce faire, MICROBIOMIQ couple des investigations *in situ* (suivi longitudinal sur 15 mois) et des expérimentations au laboratoire (expositions aigües mensuelles) basées sur une approche pluri-disciplinaire combinant la métagénomique, la méta-métabolomique, la mesure d'activité photosynthétique et la caractérisation physico-chimique des milieux. La combinaison de ces méthodes permet d'appréhender de manière novatrice et précise les interrelations entre les changements dans les facteurs environnementaux, la diversité taxonomique, l'activité microbienne et la fonction photosynthétique ainsi que leur sensibilité à la pression chimique en conditions naturelles et contrôlées, en s'appuyant sur des approches bio-informatiques.

Les résultats du projet améliorent notre compréhension du lien entre les changements naturels de la biodiversité microbienne et le fonctionnement des communautés aquatiques périphytiques ainsi que leur sensibilité à la pression chimique. Ces nouvelles connaissances sont un préalable indispensable à l'établissement de modèle permettant de prédire, dans le contexte des changements globaux, l'évolution des fonctions écosystémiques et des services associés à partir de la mesure de descripteurs de biodiversité (eDNA) et/ou de descripteurs métabolomiques. Ainsi, l'ensemble des méta-données collectées dans ce projet pourront ultérieurement supporter le développement d'outils de gestion dans le cadre d'approche de biosurveillance de la qualité des eaux.

Résultats détaillés

MICROBIOMIQ visait à répondre aux questions suivantes :

Q1. *Quel est le lien entre les changements temporels de biodiversité, d'activité microbienne et de fonction photosynthétique au sein de communautés périphytiques aquatiques en condition naturelle ?*
Q2. *Quelle est la conséquence de ces changements naturels sur la sensibilité de ces communautés au stress chimique ?*
Q3. *Quel est le lien entre les changements structuraux et fonctionnels dans la modulation de l'activité photosynthétique par la pression chimique en conditions contrôlées ?*

Pour répondre à ces questions, deux taches ont été mises en œuvre :
La **tache 1** visait à répondre à **Q**1 et **Q2**. Pour ce faire, elle a consisté en un suivi longitudinal sur l'étang de Gazinet pendant 15 mois (12 mois effectivement échantillonnés entre mars 2022 et aout 2023) de la structure taxonomique, de l'activité microbienne, de la photosynthèse (1 mesure par mois) du périphyton en parallèle du suivi de la physico-chimie de l'eau et des conditions météorologiques.
Mensuellement, une partie du périphyton collecté a été exposé à un herbicide modèle (la terbuthylazine) pendant 4h afin de déterminer le niveau de sensibilité de la communauté au niveau moléculaire/biochimique (métabolomique) et au niveau physiologique/fonctionnel (rendement photosynthétique).

La **tache 2** visait à répondre à **Q3**. Pour ce faire, une exposition de 4 semaines (juillet 2024) a été réalisée en canaux avec du périphyton collecté dans le même étang (juin 2023). La structure taxonomique, l'activité microbienne, l'activité photosynthétique du périphyton ont été mesurées au temps initial puis après 24h, 72h, 1, 2, 3 et 4 semaines en parallèle du suivi de la physico-chimie de l'eau.

Concernant la **tache 1**, un pipeline pour l'analyse combinée des données de métabolomique et de métagénomique (QIIME II, Phyoseq, Vegan, Mixomics, HillR) a été établi. Sa mise en œuvre sur nos jeux de données a mis en évidence une forte abondance du phylum des protéobactéries tout au long de l'année. Sur le plan des métabolites, la classe des amino-acides et des peptides (NPC_pathway) était la plus abondante. Les diversité alpha (intra-échantillon) et beta (inter-échantillon) basées sur les métriques de Hill (q0 : richesse des taxons=présence/absence, q1 : entropie de Shannon = diversité des taxons typiques et q2 : Inverse Simpson = diversité des taxons dominants) ont ensuite été déterminées. Malgré des variations observées au cours de l'année pour les diversités alpha sur le plan des taxons et des métabolites, seule la diversité des taxons typiques et de ceux dominants ont montré diminution significative au cours de l'expérience (Figure 1).

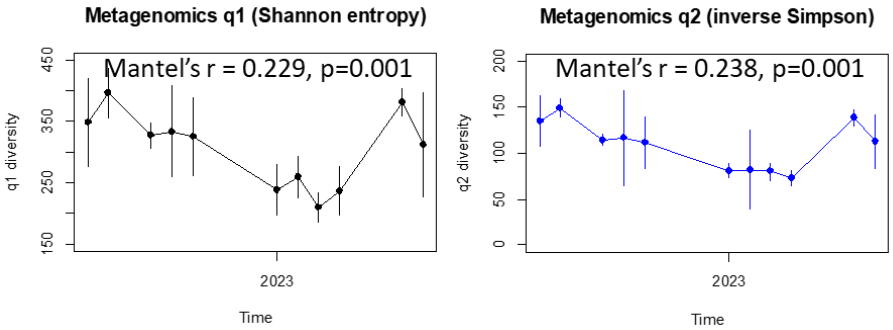

Figure 1. Fluctuation annuelle de la diversité alpha (indice de Hill q1 et q2)

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la diversité taxonomique et la diversité métabolique, témoignant d'un certain asynchronisme entre la biodiversité structurelle et la biodiversité fonctionnelle (**Q1**). En revanche, la diversité alpha taxonomique s'est révélée être corrélée aux variations de température : la diversité de tous les taxons (présence/absence) diminue avec la température, celle des taxons typiques et dominants augmente avec la température.
Concernant la diversité beta, des variations saisonnières avec des dérives ponctuelles ont été observées pour la diversité beta taxonomique tandis que l'activité microbienne a montré des variations à plus long terme (Figure 2).

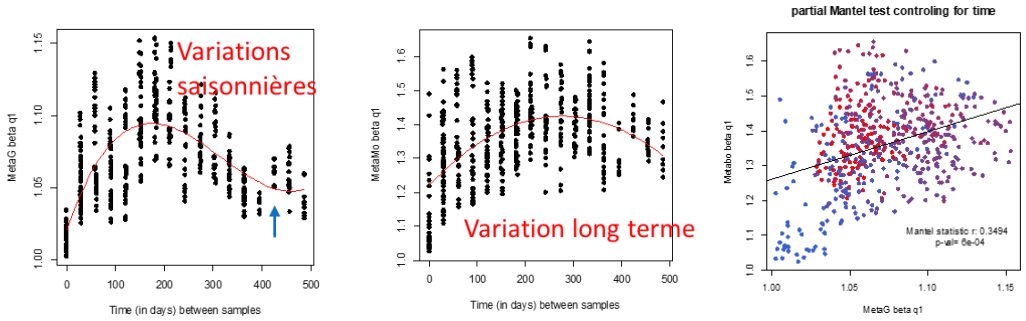

Figure 2. Variation de la diversité Beta (Hill q1, taxons typiques) pour les taxons (a) et les métabolites (b) et leur corrélation (c)

Contrairement à la diversité alpha, les diversités beta des taxons et des métabolites ont montré des corrélations faibles mais significatives (Figure 2c) même corrigées par l'autocorrélation temporelle, témoignant de l'importance de l'abondance des taxons dans la composition du méta-métabolome du périphyton.

La mise en œuvre d'une approche multi-bloc de type DIABLO a permis de mettre en évidence un rôle prépondérant de la température dans la structuration taxonomique tandis que l'activité microbienne semble être influencée par davantage de facteurs, en particulier les nutriments (SO4, NO3) (**Q1**).

En parallèle de cette dynamique de la structure et du fonctionnement de la communauté, un changement de la sensibilité a été observé à l'échelle du métabolome tandis que la sensibilité de la fonction photosynthétique était relativement stable (Medina et al. 2024, Figure 3) (**Q2**).

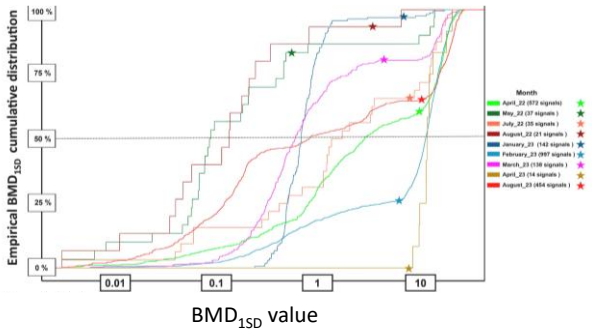

Figure 3. Comparaison de la sensibilité (BMD_{1SD}) du méta-métabolome (réponse agrégée sous la forme d'une distribution cumulée empirique) et de la photosynthèse (étoiles) entre avril 2022 et aout 2023 (Medina et al. 2024).

Ces investigations ont mis en évidence une forte hétérogénéité dans la réponse du métabolome à la terbuthylazine en termes de nombre de métabolites, de profils de réponse et de classes de métabolites suggérant que les voies de toxicité pouvaient varier dans le temps. Aussi, de manière comparative, les faibles, mais non moins significatives, variations de la sensibilité de la photosynthèse soulèvent plus globalement la question de l'interprétabilité de l'évaluation de l'état moléculaire/biochimique en termes de conséquences réelles sur la physiologie et le fonctionnement de la communauté. En l'état, ces résultats suggèrent que des réponses physiologiques similaires peuvent provenir de diverses voies moléculaires.

Ces résultats nous ont amené à aller investiguer quels étaient les facteurs internes (dynamique annuelle du métabolisme basal et du statut physiologique) et externes (facteurs environnementaux) pouvant contribuer à cette fluctuation de la sensibilité. Pour ce faire, une analyse multibloc DIABLO a été mise en œuvre (Figure 4).

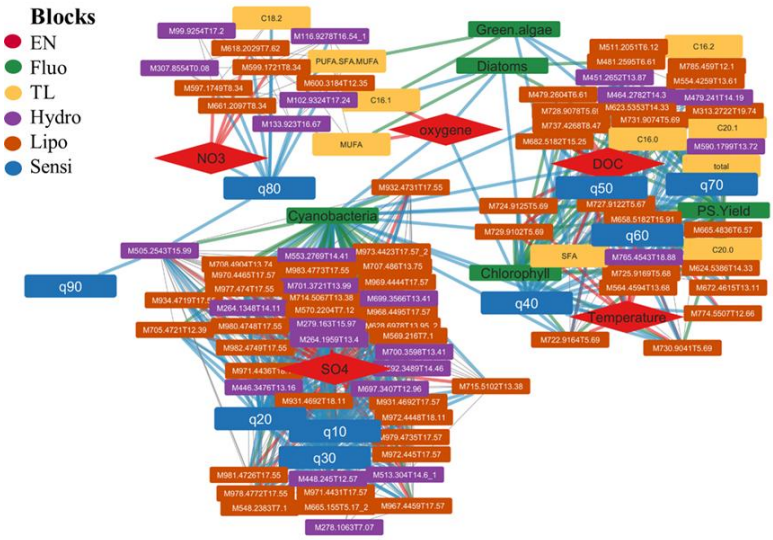

Figure 4. Réseau de corrélation (sPLS-DA multi-blocs, analyse DIABLO) de la dynamique basale du méta-métabolome du périphyton aux variations environnementales. Le réseau a été construit en utilisant les variables sélectionnées contribuant le plus dans chacun des sept blocs, avec des corrélations supérieures à 0,7 (coefficient de corrélation linéaire de Pearson). Les lignes de corrélation ont été colorées en fonction du bloc qu'elles relient : Hydro/Lipo/TL (noir), EN (rouge), fluo (vert), sensi (bleu).

Cette analyse a permis de confirmer l'influence de certains facteurs environnementaux dans la dynamique du métabolome. Elle a surtout montré que la sensibilité du métabolome pouvait être décrite selon trois niveaux : fort (q10-q30), moyen (q40-q70) et faible (q80-q90) chacun étroitement lié à un ou plusieurs paramètres physico-chimiques (SO_4^{2-}, température and DOC, NO_3^-). Ces résultats soulignent la nécessité de poursuivre les recherches afin d'affiner notre compréhension de la dynamique basale et des réponses aux micropolluants dans les communautés de périphyton influencées par de multiples facteurs environnementaux.

La tache 2 a été mise en œuvre en juillet 2023. Toutefois, une contamination bactérienne est survenue vers la troisième semaine d'exposition limitant la pleine exploitation des données acquises. Aussi les résultats sont en cours d'analyses afin de déterminer s'il sera possible de considérer cette contamination comme un facteur de stress supplémentaire ou si nous devrions nous limiter aux 14 premiers jours d'exposition.

De manière générale, le projet MICROBIOMIQ nous a permis d'acquérir un grand nombre de connaissances pour mieux comprendre la fluctuation de la biodiversité structurelle et fonctionnelle du périphyton en réponse à leur environnement, en particulier au stress chimique. Aussi, ces investigations ont mis en lumière un asynchronisme entre les diversité taxonomique et métabolique traduisant assez bien les phénomènes de redondance fonctionnelle (la structure change mais pas le fonctionnement) et de plasticité phénotypique (le fonctionnement change mais pas la structure). En effet, les différences observées entre la réponse du méta-métabolome et de la photosynthèse vont dans le même sens.

Valorisation

Articles

Arthur Medina, Melissa Eon, Nicolas Mazzella, Chloé Bonnineau, Débora Millan-Navarro, Aurelie Moreira, Soizic Morin, Nicolas Creusot. Sensitivity shift of the meta-metabolome and photosynthesis to the chemical stress in periphyton between months along one year and a half period: Case study of a terbuthylazine exposure,Science of The Total Environment, Volume 957, 2024, 177681, ISSN 0048-9697. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177681.

Communications orales :

Arthur Medina, Mélissa Eon, Débora Millan-Navarro, Nicolas Mazzella, Nicolas Creusot (2024). *Variation de sensibilité du métabolome et du rendement photosynthétique de biofilms periphytiques exposés à un herbicide modèle.* Presented at : 8ème colloque du réseau INRAE, La Rochelle, France (2024-11-13 - 2024-10-15), https://hal.inrae.fr/hal-04734503

Medina Arthur, Eon Melissa, Débora Millan-Navarro, Mazzela-Di-Bosco Nicolas, Creusot Nicolas. Seasonal fluctuation of metabolomic and photosynthetic yield response of in situ freshwater biofilms exposed to a model herbicide. *SETAC Europe 33 Annual Meeting*, SETAC EUROPE, Apr 2023, DUBLIN, Ireland. ⟨hal-04129911⟩

Posters

Nicolas Creusot, Arthur Medina, Alidou Sana, Mélissa Eon, Zoé Delporte, Josep Valls Fonayet, Chloé Bonnineau, Erwan Guichoux, Soizic Morin, Olivier Lepais (2024). *Microbiome-Metabolome association approach to unravel the relationship between taxonomic and functional biodiversity in freshwater periphyton facing global change.* Presented at : 20th annuel conference of the Metabolomics Society, Osaka (JP), Japon (2024-06-16 - 2024-06-20), https://hal.inrae.fr/hal-04734680

Arthur Medina, Mélissa Eon, Débora Millan-Navarro, Nicolas Mazzella, Nicolas Creusot. Annual variation of the meta-metabolome and photosynthesis sensitivities and their relationship in freshwater microbial communities exposed to a model herbicide. *16èmes Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique*, Jun 2024, Saint-malo, France. ⟨hal-04768319⟩

Arthur Medina, Mélissa Eon, Nicolas Creusot. Metabolomics insight on the photosynthesis impairment under chemical stress in freshwater biofilms in agriculture context. *L'école automnale du RFMF*, Oct 2023, Sainte-Foy-lès-Lyon, France. ⟨hal-04768456⟩