

# Dynamique des populations amibiennes et de leur microbiome au sein d'un réseau d'eau potable

■ V. DELAFONT<sup>1,2</sup>, D. BOUCHON<sup>1</sup>, M. JOYEUX<sup>2</sup>, Y. HÉCHARD<sup>1</sup>, L. MOULIN<sup>2</sup>

Mots-clés : amibes libres, bactéries, eau potable, interactions hôte-micro-organismes

Keywords: free-living amoebae, bacteria, drinking water, host-microorganisms interactions

## Introduction

Le terme « amibe » désigne un ensemble de micro-organismes eucaryotes unicellulaires hétérotrophes, se déplaçant par projection cytoplasmique. Les amibes libres sont des micro-organismes omniprésents dans les sols et les milieux hydriques naturels et anthropiques. Les amibes actuelles descendent d'une forme de vie datant d'environ 2 milliards d'années, représentant très probablement une des premières émergences de la vie eucaryote [STANLEY, 1973]. Ces micro-organismes, comme de nombreux autres unicellulaires eucaryotes, se multiplient principalement de façon asexuée, par fission binaire [BYERS, 1979]. Du fait de la description initiale de ces micro-organismes, basée sur des critères exclusivement morphologiques, le terme amibe rassemble en réalité un groupe polyphylétique. Ainsi, plus de 5 000 espèces d'amibes sont actuellement décrites, et on estime la présence d'environ 25 000 espèces amibiennes différentes, réparties au sein de plusieurs superrègnes, présentant une grande diversité de morphologie et de mode de vie [ADL *et al.*, 2007]. La majorité des amibes sont en mesure de proliférer sans nécessiter l'infection d'un hôte, et sont donc communément appelées « amibes libres ». Ces dernières sont largement répandues dans les milieux naturels et anthropiques, notamment les écosystèmes microbiens présents dans les sols et l'eau, ainsi que dans l'air [RODRÍGUEZ-ZARAGOZA *et al.*, 1993 ; RODRÍGUEZ-ZARAGOZA,

1994 ; LORET et GREUB, 2010 ; CONZA *et al.*, 2013]. Dans les environnements hydriques, les amibes libres sont isolées à partir de l'eau circulante ainsi que des biofilms recouvrant les surfaces immergées [RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, 1994]. La majorité des amibes libres ont un mode de vie à deux phases, étroitement régulées par les conditions environnementales. Dans des conditions favorables permettant la prolifération, les amibes sont sous une forme métaboliquement active, le trophozoïte. Sous l'effet de divers stress, tels que des variations de températures, de pH, de pression osmotique, ou de disponibilité en nutriments, les amibes libres ont la capacité d'adopter une forme de dormance et de résistance, le kyste [FOUQUE *et al.*, 2012 ; FOUQUE, 2013]. Les kystes amibiens présentent ainsi une très haute résistance face à un large panel de traitements biocides, à la température, aux irradiations par UV et rayons X [PENLEY *et al.*, 1989 ; HILLEBRANDT et MÜLLER, 1991 ; STOREY *et al.*, 2004 ; HIJNEN *et al.*, 2006 ; COULON *et al.*, 2010 ; DUPUY *et al.*, 2014]. Ainsi, l'efficacité partielle des traitements de désinfection de l'eau sur ces dernières explique au moins en partie la persistance des amibes libres au sein des réseaux d'eau potable, grâce notamment à leur forme kystique. Ce constat est étayé par l'omniprésence des amibes libres dans les réseaux d'eau potable où l'analyse a été réalisée [THOMAS et ASHBOLT, 2011]. Au sein de ces réseaux, les amibes libres se nourrissent d'autres micro-organismes – principalement bactériens – par un mécanisme de phagocytose. Cette activité participe à la régulation des populations bactériennes colonisant le réseau. Cependant, alors que la majorité des bactéries internalisées par les amibes libres sont dégradées à l'issue de la phagocytose, certaines bactéries sont pourvues

<sup>1</sup> Université de Poitiers – Laboratoire Écologie et Biologie des interactions – UMR CNRS 7267 – Équipe microbiologie de l'eau – 1, rue Georges-Bonnet – TSA51106 – 86073 Poitiers cedex 9.

<sup>2</sup> Direction de la recherche et du développement pour la qualité de l'eau – R&D Biologie – Eau de Paris – 33, avenue Jean-Jaurès – 94200 Ivry-sur-Seine.

de mécanismes de résistance à cette prédation. L'exemple le mieux décrit dans la littérature est celui de *Legionella pneumophila*, une bactérie responsable de graves pneumonies chez l'homme, et dont le seul foyer de multiplication environnemental décrit est la multiplication intra-amibienne [ROWBOTHAM, 1980; ISBERG *et al.*, 2009]. Depuis lors, une grande diversité de bactéries résistantes aux amibes a été décrite, adoptant des modes de vie intracellulaire strict ou facultatif, et comprenant de nombreux pathogènes (le plus souvent opportunistes), mais aussi des lignées bactériennes extrêmement peu décrites [GREUB et RAOULT, 2004; HORN et WAGNER, 2004; THOMAS *et al.*, 2010; DELAFONT *et al.*, 2015]. De nombreuses similitudes existent entre le processus phagocytaire des amibes libres et celui des macrophages humains. À cause de ces analogies, il est probable que les amibes libres permettent la prolifération et l'émergence de bactéries pathogènes de l'homme, représentant ainsi un problème potentiel de santé publique [MOLMERET *et al.*, 2005; THOMAS et ASHBOLT, 2011; CATEAU *et al.*, 2014a]. Il est d'ailleurs remarquable que les genres bactériens majoritairement responsables d'infections liées à l'eau potable (*Legionella*, *Mycobacterium* et *Pseudomonas*) ont tous été décrits comme pouvant survivre au sein des amibes [NAUMOVA *et al.*, 2016].

Du fait de l'omniprésence des amibes libres au sein des réseaux d'eau potable, liée à leur résistance partielle aux traitements et à leur capacité à se multiplier au sein des réseaux, il apparaît essentiel de mieux comprendre la dynamique des populations amibiennes et de leur microbiome bactérien, à l'échelle d'un réseau d'eau potable.

Dans cette optique, une vaste campagne d'échantillonnage a été mise en place, couvrant le réseau d'eau potable de la ville de Paris, sur une période d'un an. Les échantillons d'eau collectés ont été analysés pour la présence d'amibes libres, et ont permis l'isolement et l'identification des communautés amibiennes et de leur microbiome bactérien par une approche de pyroséquençage. La confrontation des données taxonomiques avec divers paramètres physico-chimiques caractérisant les échantillons d'eau analysés a également permis d'émettre des hypothèses quant

aux facteurs abiotiques ayant un impact sur les communautés amibiennes.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Campagne d'échantillonnage

La campagne d'analyse des échantillons d'eau a été mise en place sur le réseau d'eau potable de la ville de Paris. Les échantillons ont été prélevés entre septembre 2012 et octobre 2013. Les prélèvements d'eau ont été effectués sur 32 sites différents répartis selon les réservoirs de stockage d'eau potable et les points de fin du réseau public de distribution (figure 1).

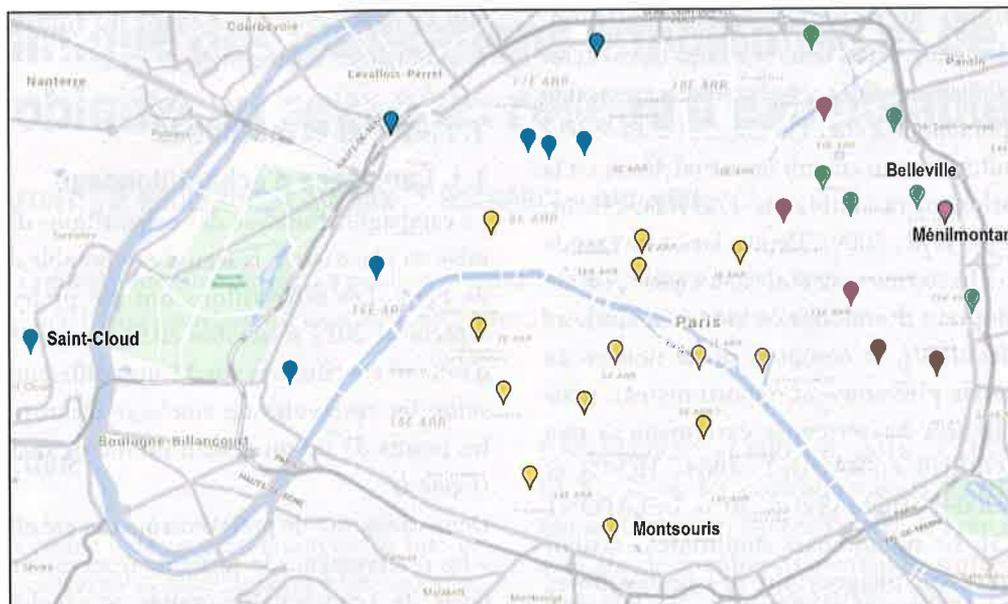
Deux catégories de prélèvements ont été effectuées :

- les prélèvements de sortie de réservoirs représentatifs de l'eau potable traitée et stockée, avant d'alimenter le réseau de distribution ;
- et les prélèvements de fin de réseau correspondant à l'extrémité du réseau public de distribution de l'eau potable, avant que celui-ci ne se trouve au sein des habitations, constituant une zone privée.

Les prélèvements ont été effectués à un rythme hebdomadaire pour les échantillons de sortie de réservoir, et à un rythme mensuel pour les échantillons de fin de réseau. Une équipe de préleveurs accrédités a pris en charge la récupération de l'ensemble des échantillons d'eau analysés. La mesure des paramètres physico-chimiques (décrit ci-dessous) réalisée au cours de cette étude a été effectuée au laboratoire d'Eau de Paris.

### 1.2. Traitement des échantillons d'eau

Les échantillons d'eau ont été conditionnés en flacons d'un litre contenant 20 mg de thiosulfate de sodium, afin de neutraliser le chlore résiduel présent dans l'eau potable. Lors du prélèvement, et avant le flaconnage, les mesures de température, concentrations en chlore libre et total (norme NF-EN-ISO 7393-2), pH (norme NF T90-008) et conductivité (norme NF-EN 27888) ont été effectuées. Les valeurs de concentrations en chlore libre et total, turbidité, température et conductimétrie ont été collectées à chaque point de prélèvement en fin de réseau. Les flacons ont ensuite été conservés à 4 °C, puis acheminés au laboratoire pour analyses microbiologiques dans un délai de 6 heures. Deux litres d'eau ont été prélevés par site. L'ensemble de l'échantillon a été filtré sur une



Alimentation par le réservoir de Belleville (●), Ménilmontant (●), Montsouris (●) et Saint-Cloud (●).  
**Figure 1. Répartition géographique des points de prélèvements effectués sur les réservoirs (points libellés) et le réseau de distribution du réseau d'eau potable de Paris. Les sites de prélèvements de fin du réseau sont colorés en fonction de leur réservoir d'alimentation**

rampe portant une membrane nitrocellulosique d'une porosité de 3 µm.

### 1.3. Culture d'amibes libres à partir des échantillons environnementaux

Les filtres, récupérés pour chaque prélèvement, ont été déposés sur deux milieux permettant l'enrichissement amibien, à raison d'un demi-filtre par type de milieu. Les milieux d'enrichissement ont été constitués de la même base de gélose non nutritive en tampon PAS (*Page's Amoeba Saline*; citrate de sodium 1 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0,4 mM, MgSO<sub>4</sub> 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM; agar 15 g/L), puis ensemencés par 1 mL d'une suspension d'*Escherichia coli* MG1655 (souche K-12) vivantes à une concentration de 5 × 10<sup>5</sup> bactéries/µL, ou par 1 mL d'une suspension de *Saccharomyces cerevisiae* vivantes à une concentration de 2,5 × 10<sup>5</sup> cellules/µL. Les observations microscopiques ont été effectuées à partir de 3 jours de mise en culture à 30 °C, et tous les 3 jours sur une durée de 4 semaines. Le développement d'amibes est matérialisé par leur déplacement à la surface de la gélose, créant ainsi un front de migration qui est observé au microscope à contraste de phase.

### 1.4. Extraction d'ADN des isolats amibiens

Les extractions d'ADN à partir des isolats amibiens collectés au front de migration ont été effectuées

à l'aide de l'automate d'extraction MagNA Pure Compact (Roche), utilisant le protocole DNA Bacteria V3.2. Les échantillons collectés ont subi en amont un prétraitement consistant en cinq cycles de choc thermique (30 secondes en azote liquide, puis 1 minute au bain sec à 95 °C), suivi d'un traitement à la protéinase K (2 mg/mL) pendant 30 minutes à 40 °C, ainsi que deux cycles de lyse mécanique par agitation en tubes contenant 400 mg de billes de verres (diamètre 200-300 µm), pendant 30 secondes à vitesse 6 en utilisant l'automate FastPrep (BIO101). Les ADN totaux ainsi extraits ont été élués dans un volume final de 50 µL, puis stockés à -20 °C.

Les extractions d'ADN à partir des souches bactériennes et amibiennes isolées ont été effectuées par lyse mécanique comme décrit précédemment, puis à l'aide du kit d'extraction Nucleospin Tissue (Macherey Nagel), en suivant les recommandations du fournisseur. Les ADN ainsi extraits ont été élués dans un volume final de 60 µL, puis stockés à -20 °C.

### 1.5. Pyroséquençage

Les échantillons d'ADN issus des isolats amibiens ont été regroupés et catégorisés en fonction des sites d'alimentation, puis ont servi de matrice pour des réactions de *polymerase chain reaction* (PCR).

Afin de déterminer la diversité procaryote, les amorces U341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') et U926R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3') ciblant les régions variables V3 à V5 du gène codant l'ARNr 16S ont été utilisées [BAKER *et al.*, 2003]. Dans le but de cibler la diversité amibienne, les amorces Ami6F1 (5'-CCAGCTCCAATAGCGTATATT-3') et Ami9R (5'-GTTGAGTCGAATTAAGCCGC-3') ciblant un fragment du gène codant l'ARNr 18S ont été utilisées [THOMAS *et al.*, 2006]. Les amorces utilisées pour les PCR de préparation au pyroséquençage ont été synthétisées avec les adaptateurs nucléotidiques appropriés, et un code-barres de dix nucléotides, spécifiques de chaque échantillon séquençé, a également été ajouté sur chacune des amorces antisens.

Le mélange réactionnel des PCR a été effectué dans un volume final de 25 µL, contenant 2,5 µL de tampon de réaction 10× (1× final, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 400 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate, 500 nM de chaque amorce, et 1U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). Les réactions de PCR ont été effectuées avec une étape de dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes, puis 30 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, fusion à 50 °C pendant 30 secondes et élongation à 72 °C pendant 1 minute. Une étape d'élongation finale a été appliquée à 72 °C pendant 5 minutes.

Les amplicons ont ensuite été purifiés deux fois à l'aide du kit Agencourt AMPure XP (Beckmann Coulter). La pureté et la taille des amplicons ont été vérifiées sur bioanalyseur en utilisant le kit DNA 100 (Agilent). Les concentrations en ADN ont été évaluées par quantification de la fluorescence à l'aide du kit Quant-It PicoGreen dsDNA (Life Technologies), et chaque échantillon a été ajusté à une concentration de 10<sup>9</sup> molécules d'ADN/µL. Un mélange équimolaire de l'ensemble des échantillons a été préparé en vue du pyroséquençage, qui a été effectué selon les recommandations du fournisseur (*Amplicon Library Preparation Manual*, Roche). Les réactions de pyroséquençage ont été effectuées sur une plateforme GS junior (Roche) et l'ensemble des données brutes résultantes sont disponibles sur la base de données Sequence Read Archive sous les numéros d'accès PRJNA255357 et PRJNA279061.

## 1.6. Analyses bio-informatiques

Les séquences brutes générées à l'issue du pyroséquençage ont été traitées avec le progiciel QIIME v.1.8.0 [CAPORASO *et al.*, 2010]. Les séquences de taille inférieure à 250 nucléotides ou supérieure à 700 ont été automatiquement exclues du jeu de données, ainsi que celles arborant un score de qualité moyen inférieur à 25 (sur un cadre de 50 nucléotides consécutifs), plus de six bases ambiguës, des homopolymères de six nucléotides ou plus, et plus de deux mésappariements au niveau de la séquence des amorces. La présence et l'élimination de potentielles séquences chimériques ont été effectuées par l'utilisation du logiciel Uchime 6.0 [EDGAR *et al.*, 2011]. Les séquences ainsi filtrées ont été groupées en unités taxonomiques opérationnelles (*operational taxonomic units*, OTU) avec un seuil de similarité de 97 %. Les OTU ne comprenant qu'une seule séquence ont été éliminées, car résultant fréquemment d'artefacts de séquençage, et une séquence représentative, la plus abondante de chaque OTU, a ensuite été sélectionnée. Ces séquences représentatives ont été alignées avec le logiciel Muscle [EDGAR, 2004]. L'assignement taxonomique des séquences représentatives a été effectué par l'utilisation du logiciel *Uclust consensus taxonomy assigner* et la base de données de référence SILVA v111 [PRUESSE *et al.*, 2007 ; EDGAR, 2010]. Les données taxonomiques ont été représentées graphiquement à l'aide du logiciel Explicet [ROBERTSON *et al.*, 2013]

## 1.7. Analyses statistiques

Les corrélations entre les observations biologiques et les paramètres physico-chimiques ont été investiguées sous R avec le package Vegan, via des analyses en composantes principales (ACP) et analyses des correspondances canoniques (ACC) [OKSANEN *et al.*, 2013]. Afin d'évaluer l'effet significatif des variables incluses dans les ACP et ACC, un test F de permutation (1 000 répétitions) a été effectué pour chaque analyse exploratoire.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Présence des amibes libres au sein d'un réseau d'eau potable

Le suivi des amibes libres présentes dans le réseau d'eau potable de Paris a été effectué sur la base de

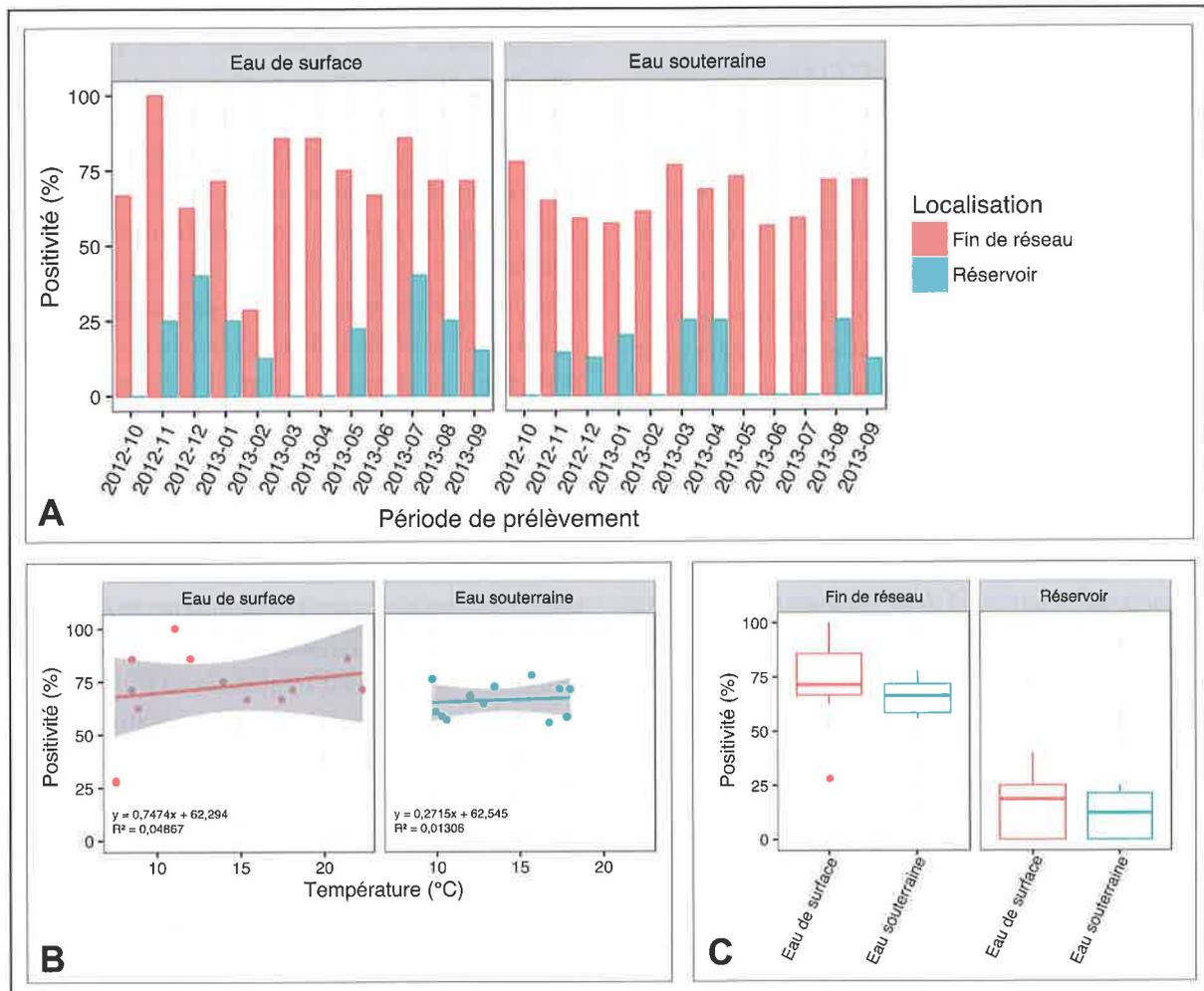


Figure 2. Proportion des échantillons d'eau porteurs d'amibes libres en fonction de la période de prélèvement (A). Relations entre la fréquence d'isolement des amibes libres et la température de l'eau (B). Impact de la localisation des sites de prélèvement sur la fréquence d'isolement des amibes libres (C)

l'analyse de 398 échantillons d'eau, prélevés sur une période d'un an. Tous les sites sélectionnés pour analyse se sont avérés positifs au moins une fois pour la présence d'amibes libres, soulignant l'omniprésence de ces micro-organismes au sein du réseau. Ces résultats sont en accord avec la littérature scientifique récente qui a démontré la présence d'amibes libres dans les réseaux d'eau potable en France et dans d'autres pays industrialisés [THOMAS *et al.*, 2008; DELAFONT *et al.*, 2013, 2016]. La présence d'amibes libres a été analysée en fonction de la période de prélèvement et de la localisation des sites (figure 2).

Il a été possible de mettre en évidence une différence significative (Anova,  $p < 0,001$ ; figure 2C) concernant la présence d'amibes libres en fonction de la

localisation des sites de prélèvements, avec une plus forte présence en fin de réseau (166 échantillons positifs sur 247 ; 67,2 %) qu'en sortie de réservoir (23 échantillons positifs sur 151 ; 15,2 %). Cette observation semble confirmer le modèle de colonisation proposé précédemment, suggérant un enrichissement de la communauté amibienne aux points distaux des sites de traitement des réseaux d'eau potable [THOMAS et ASHBOLT, 2011].

L'analyse de la présence d'amibes en fonction de l'origine de l'eau n'a pas permis d'observer de différence notable. De même, aucun impact notable de la période de prélèvement ou de la température des échantillons d'eau n'a pu être observé sur la présence d'amibes libres dans le réseau (figure 2A, B). Il n'est cependant pas à exclure que la composition de la

communauté amibienne soit touchée par ces différents paramètres, sans pour autant observer de variations quant à la présence de ces micro-organismes.

## 2.2. Diversité des amibes libres et impact des facteurs environnementaux

La composition des communautés amibiennes a été déterminée par l'obtention et la classification de 60 700 séquences d'ADN issues des isolats d'amibes libres collectés lors de cette étude. Ces données ont ainsi permis de dresser un portrait global de la diversité amibienne colonisant le réseau d'eau potable de Paris (figure 3). Sur l'ensemble du réseau d'eau potable, 134 OTU à 97 % de similarité ont été identifiés, regroupés en neuf taxons distincts. Il a été observé la présence majoritaire des genres *Vermamoeba* (anciennement *Hartmannella*), *Acanthamoeba* et *Echinamoeba*, représentant à eux seuls 88 % des séquences amibiennes analysées (figure 3A). De manière intéressante, il a été possible de constater la présence des amibes du genre *Echinamoeba* exclusivement au sein des échantillons approvisionnés par des sources d'eau souterraine. De manière similaire, la présence d'amibes du clade LKM74 a pu être observée uniquement au sein d'échantillons provenant des réservoirs de stockage. Alors que les genres

majoritairement présents identifiés au cours de cette étude ont été décrits à plusieurs reprises comme des colonisateurs des réseaux d'eau potable, les résultats obtenus représentent la première description d'amibes du clade LKM74 colonisant ce type d'environnement, et dont la récente caractérisation a fait l'objet d'une étude [THOMAS *et al.*, 2008; DELAFONT *et al.*, 2013; BLANDENIER *et al.*, 2016]. Par ailleurs, l'analyse de la diversité des amibes libres colonisant le réseau d'eau potable de Paris n'a pas permis de relever la présence d'amibes pathogènes, telles que *Naegleria fowleri* ou *Balamuthia mandrillaris*. En revanche, le genre *Acanthamoeba* est considéré comme un pathogène opportuniste qui, bien que rarement isolé chez l'homme, peut provoquer chez certains patients de graves maladies [MARCIANO-CABRAL et CABRAL, 2003].

La possibilité de mesurer et collecter un ensemble de paramètres physico-chimiques caractérisant les échantillons de fin de réseau a permis notamment d'appliquer des approches statistiques exploratoires dans le but de mieux comprendre l'importance de ces facteurs abiotiques sur les communautés amibiennes (figure 3B). Les résultats issus des analyses canoniques des correspondances (ACC) ont suggéré des corrélations entre les variations de pH et de concentration

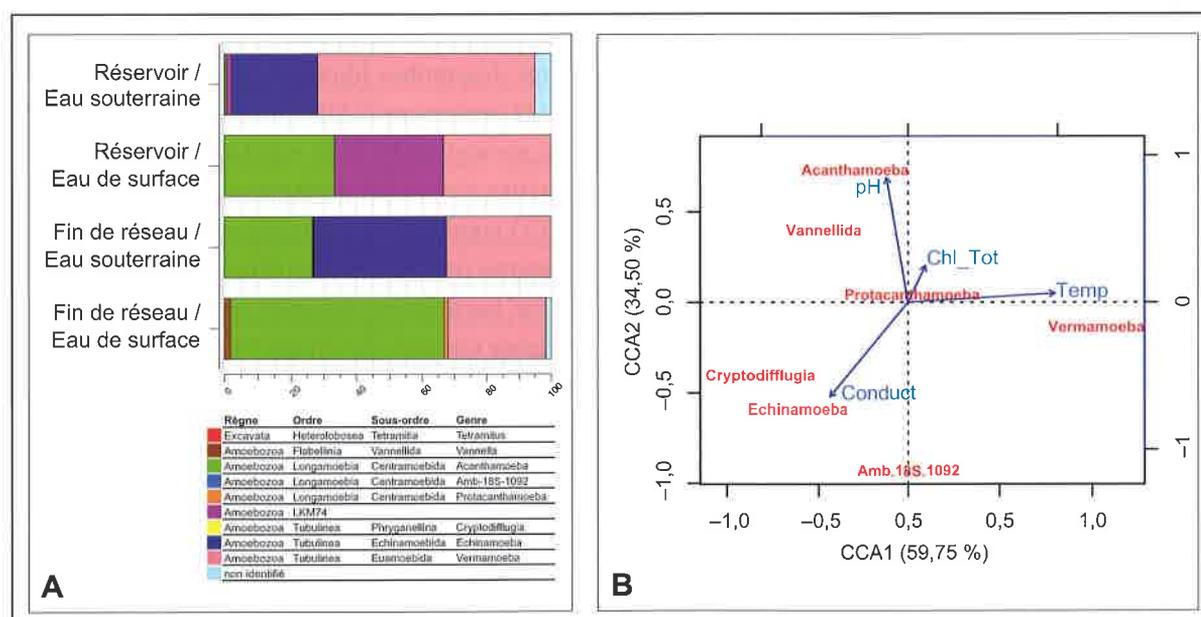


Figure 3. Diversité des amibes libres identifiées par pyroséquençage en fonction de la localisation des sites de prélèvement et de l'origine de l'eau (A). Analyses canoniques des correspondances (ACC) permettant d'explorer l'impact de différents paramètres physico-chimiques environnementaux sur la composition taxonomique des communautés amibiennes (B). La significativité des variables a été évaluée en effectuant 1 000 permutations (pseudo  $F = 4,5152$ ,  $p = 0,026$ )

en chlore total avec la présence d'amibes du genre *Acanthamoeba*.

Ces résultats corroborent plusieurs études suggérant que les amibes du genre *Acanthamoeba* sont comparativement plus résistantes aux traitements chlorés que d'autres genres amibiens classiquement rencontrés dans les réseaux d'eau [COULON *et al.*, 2010; DUPUY *et al.*, 2014]. Une corrélation entre la température de l'eau et la présence de *Vermamoeba*, ainsi que de la conductivité de l'eau et de la présence d'*Echinamoeba* et de *Cryptodiffugia* ont également pu être mises en évidence. De manière globale, l'ACC a mis en évidence que les variations de pH, de conductivité, de température et de concentration en chlore total permettent d'expliquer 51,6 % des variations observées dans la composition des communautés amibiennes (inertie contrainte). Les variations observées grâce aux ACC exploratoires ont par la suite été confirmées statistiquement, indiquant notamment une augmentation de la présence de *Vermamoeba* sur la période de juin à septembre, correspondant aux mois où la température de l'eau est la plus élevée ( $P = 0,011$ , test  $t$  de White). De même, il a été constaté la présence exclusive d'*Echinamoeba* au sein des échantillons approvisionnés en eau souterraine, caractérisés notamment par une conductivité plus élevée que les échantillons d'eau provenant de sources en surface ( $P = 0,015$ , test  $t$  de White). Il est à noter que ces résultats ne permettent pas de différencier l'influence de l'origine de l'eau (souterraine ou de surface) de celle des traitements employés, adaptés au type d'eau d'approvisionnement. Il est cependant probable que ces deux facteurs soient corrélés dans leur impact sur la composition des communautés amibiennes en aval. L'analyse de la composition taxonomique des communautés amibiennes colonisant le réseau d'eau potable a permis de mettre en évidence un fort impact saisonnier, mais également celui de la localisation au sein du réseau, ainsi que des conditions associées au traitement chloré du réseau sur ces communautés. Alors que le suivi des amibes libres apparaît clairement comme un élément crucial pour la surveillance de la qualité microbiologique des réseaux d'eau potable, il n'existe actuellement aucun consensus quant aux méthodes de suivi utilisées. L'analyse des différents protocoles décrits dans la littérature fait état

de grandes variations, pouvant fortement avoir un impact sur les résultats obtenus et leurs interprétations. Ainsi, les volumes d'eau analysés peuvent varier entre 50 mL et 50 L, avec des étapes de concentration par centrifugation et/ou filtration sur membranes nitrocellulosiques de porosité comprise entre 0,2 et 3  $\mu\text{m}$  [THOMAS *et al.*, 2008; DELAFONT *et al.*, 2013, 2016; GARCIA *et al.*, 2013; MAGNET *et al.*, 2013; SHANAN *et al.*, 2015]. Ainsi, dans une volonté de normalisation, il semble important de pouvoir proposer une méthode de référence permettant un suivi fiable des amibes libres du réseau, ainsi que des comparaisons interétudes robustes. Cette proposition se base ainsi sur le protocole détaillé de l'ouvrage *L'Analyse de l'eau*, chapitre 8 [RODIER *et al.*, 2011]. Le suivi de ce protocole permet de la sorte de détecter la présence d'amibes cultivables, ainsi que de déterminer leur concentration, sur la base des calculs du nombre le plus probable. Les amibes isolées sur gélose peuvent ensuite être identifiées sur la base du séquençage du gène codant l'ARNr 18S, soit par séquençage dérivé de Sanger pour les isolats clonaux, soit par séquençage à haut débit comme décrit au cours de cette étude [THOMAS *et al.*, 2006; DELAFONT *et al.*, 2013].

### 2.3. Le microbiome des amibes libres

La description de la diversité bactérienne du microbiome des amibes libres a reposé sur l'analyse de 55 077 séquences d'ADN, classées en 1 397 OTU avec un seuil de 97 % de similarité. Ce consortium bactérien s'est révélé extrêmement divers, composé de 153 taxons bactériens différents parmi lesquels 85 genres ont pu être identifiés. L'analyse de la diversité bactérienne associée aux amibes a mis en évidence une forte hétérogénéité des communautés en fonction du site de prélèvement, et par extension du réservoir d'approvisionnement (*figure 4A*). Dans le but de mettre en évidence les bactéries les plus fréquemment associées aux amibes parmi ce microbiome très diversifié, un *microbiome cœur* a été défini, représentant les bactéries associées aux amibes dans l'ensemble des échantillons étudiés (*figure 4*).

Alors que le microbiome cœur ne représente que 8,4 % de la diversité observée en association avec les

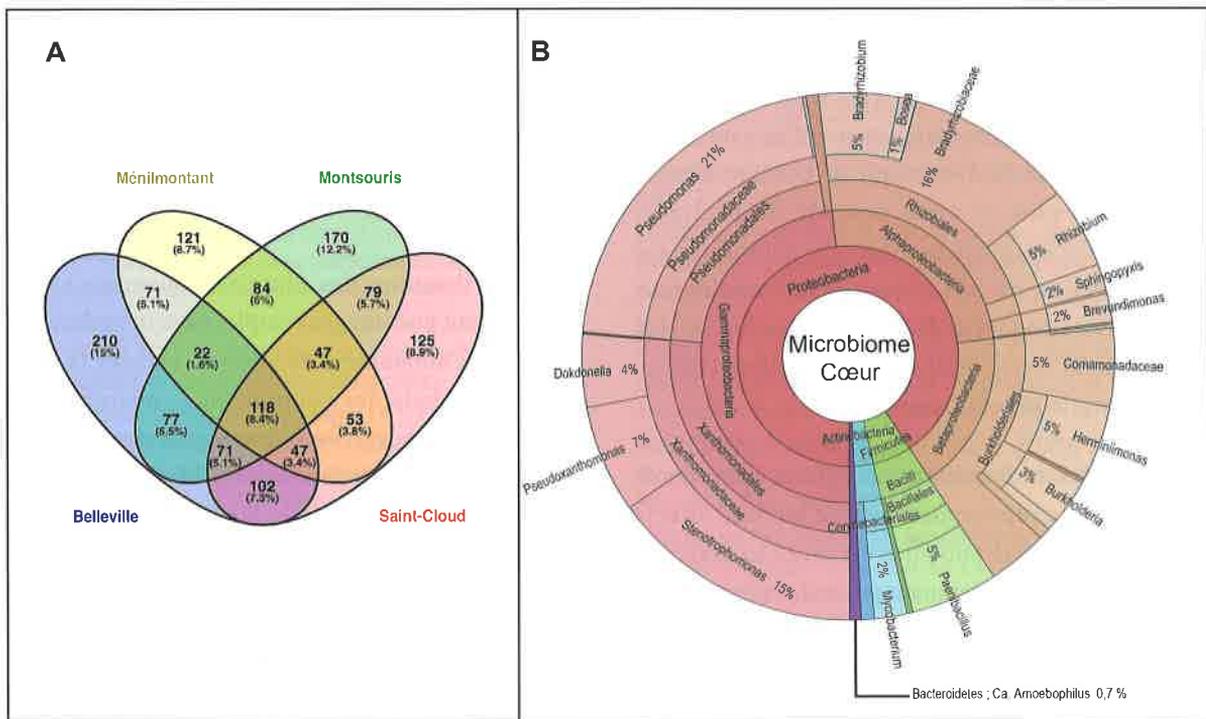


Figure 4. Diversité des bactéries associées aux amibes isolées du réseau d'eau potable de Paris. Répartition des OTU à 97 % de similarité en fonction des réservoirs d'alimentation représenté sous la forme d'un diagramme de Venn (A). Composition taxonomique du « microbiome cœur » identifié au sein des amibes libres (B)

amibes, les 118 OTU le composant représentent 62,6 % de l'ensemble des séquences obtenues (soit 34 467 séquences), soulignant l'association préférentielle et la prépondérance de ces taxons bactériens en présence d'amibes. Parmi les 118 OTU du microbiome cœur, 21 genres ont pu être identifiés, affiliés majoritairement au phylum des protéobactéries, mais également des *Firmicutes*, *Actinobactéries* et *Bacteroidetes* (figure 4B). Au sein de ce microbiome cœur, plusieurs genres potentiellement problématiques dans le contexte des réseaux d'eau potable ont pu être identifiés, notamment *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et *Mycobacterium*, représentant des problèmes potentiels de santé publique, notamment en milieu hospitalier [CATEAU *et al.*, 2014a]. Par ailleurs, les interactions entre ces membres prépondérants du microbiome cœur et diverses amibes libres ont pu être confirmées par plusieurs études complémentaires [CATEAU *et al.*, 2008 ; DELAFONT *et al.*, 2014 ; CATEAU *et al.*, 2014b]. Il est important de préciser que l'approche utilisée dans cette étude concernant l'identification bactérienne ne permet pas d'obtenir une affiliation taxonomique jusqu'à l'espèce. Ainsi, bien que certaines espèces des genres *Pseudomonas*,

*Stenotrophomonas* et *Mycobacterium* soient pathogènes pour l'homme, de nombreuses autres sont classiquement trouvées dans divers environnements et ne sont pas décrites comme pathogènes.

## Conclusion

Les amibes libres sont des micro-organismes omniprésents au sein des réseaux d'eau potable. L'ensemble de la littérature existante au sujet des amibes libres s'accorde sur leur capacité de colonisation, de persistance et de prolifération au sein de ces réseaux, indépendamment de la nature des traitements de potabilisation utilisés. Malgré ce constat, la dynamique de cette communauté de micro-organismes n'a été que très peu étudiée. Les amibes libres nécessitent cependant une attention particulière, notamment du fait qu'elles pourraient favoriser l'émergence de bactéries potentiellement pathogènes pour l'homme dans les réseaux. Les résultats obtenus présentent ainsi la première étude des communautés amibiennes et de leur dynamique à l'échelle d'un réseau d'eau potable, et mettent en avant la nécessité du suivi de ces micro-organismes au sein de ce type d'environnement.

L'omniprésence des amibes libres au sein du réseau d'eau potable, avec notamment une forte présence en fin de réseau, est en accord avec les données de la littérature, et souligne l'importance d'une meilleure connaissance de la dynamique de ces micro-organismes. De plus, il a été possible de souligner l'importance de plusieurs facteurs abiotiques sur la composition de cette communauté amibienne, notamment l'origine de l'eau, la localisation au sein du réseau, la concentration en chlore libre (liée au traitement), le pH et la température.

Alors que les amibes libres identifiées au cours de cette étude ne représentent pas de menace directe en matière de santé publique, certaines bactéries en association avec ces dernières pourraient être problématiques. L'utilisation d'une approche tirant profit du séquençage à haut débit a permis de décrire la diversité des bactéries associées aux amibes, comprenant ainsi 153 taxons. Face à cette grande diversité, un microbiome cœur a été défini, permettant probablement de mettre en évidence les bactéries dont les relations avec les amibes sont les plus étroites. Ce groupe comprend au moins 21 genres bactériens parmi lesquels plusieurs pathogènes opportunistes tels que *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et *Mycobacterium*. On peut également noter, au sein de cette commu-

nauté, l'absence de légionelles. La capacité de ces bactéries à tirer profit de la présence d'amibes libres pour persister au sein des réseaux d'eau potable est donc un élément important à prendre en compte afin d'établir des stratégies de lutte efficaces contre ce groupe de bactéries.

La baisse drastique des coûts de séquençage à haut débit devrait encourager l'emploi de cette technique, qui permet notamment de pouvoir analyser la composition globale des communautés microbiennes (procaryotes et eucaryotes) des réseaux d'eau potable, sans étape de culture sélective préalable [DOUTERELO *et al.*, 2014; PROCTOR et HAMMES, 2015]. Les approches qualifiées de *metabarcoding* (séquençage massivement parallèle d'un locus génique taxonomiquement discriminant) représentent des méthodes puissantes, peu coûteuses, nécessitant des compétences modérées en bio-informatique, tout en étant facilement sous-traitables. Alors que dans de nombreux autres champs d'études, reliés aussi bien à la médecine qu'à l'écologie microbienne, les techniques de *metabarcoding* se sont démocratisées, il paraît nécessaire d'encourager l'utilisation de cette approche pour décrire les communautés de micro-organismes (amibes, bactéries...) colonisant les réseaux d'eau potable.

## Bibliographie

ADL S.M., LEANDER B.S., SIMPSON A.G.B., ARCHIBALD J.M., ANDERSON O.R., BASS D., *et al.* (2007) : « Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists ». *Syst. Biol.* ; 56 : 684-9.

BAKER G.C., SMITH J.J., COWAN D.A. (2003) : « Review and re-analysis of domain-specific 16S primers ». *J. Microbiol. Methods* ; 55 : 541-55.

BLANDENIER Q., SEPPEY C.V.W., SINGER D., VLIMANT M., SIMON A., DUCKERT C., LARA E. (2016) : « *Mycamoeba gemmipara* nov. gen., nov. sp., the first cultured member of the environmental dermamoebidae clade LKM74 and its unusual life cycle ». *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 64(2) : 257-65.

BYERS T.J. (1979) « Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba* ». *Int. Rev. Cytol.* ; 61 : 283-338.

CAPORASO J.G., KUCZYNSKI J., STOMBAUGH J., BITTINGER K., BUSHMAN F.D., COSTELLO E.K., *et al.*

(2010) : « QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data ». *Nat. Methods* ; 7 : 335-6.

CATEAU E., DELAFONT V., HECHARD Y., RODIER M.H. (2014a) : « Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? » *J. Hosp. Infect.* ; 87 : 131-40.

CATEAU E., IMBERT C., RODIER M.-H. (2008) : « *Hartmannella vermiformis* can be permissive for *Pseudomonas aeruginosa* ». *Lett. Appl. Microbiol.* ; 47 : 475-7.

CATEAU E., MAISONNEUVE E., PEGUILHAN S., QUELLARD N., HECHARD Y., RODIER M.-H. (2014b) : « *Stenotrophomonas maltophilia* and *Vermamoeba vermiformis* relationships: Bacterial multiplication and protection in amoeba-derived structures ». *Res. Microbiol.* ; 165 : 847-51.

CONZA L., PAGANI S.C., GAIA V. (2013) : « Presence of *Legionella* and free-living Amoebae in composts and

- bioaerosols from composting facilities ». *PLoS ONE* 8(7): e68244. doi:10.1371/journal.pone.0068244.
- COULON C., COLLIGNON A., MCDONNELL G., THOMAS V. (2010) : « Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J. Clin. Microbiol.* ; 48 : 2689-97.
- DELAFONT V., BOUCHON D., HÉCHARD Y., MOULIN L. (2016) : « Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network ». *Water Res.* ; 100 : 382-92.
- DELAFONT V., BROUKE A., BOUCHON D., MOULIN L., HÉCHARD Y. (2013) : « Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water ». *Water Res.* ; 47 : 6958-65.
- DELAFONT V., MOUGARI F., CAMBAU E., JOYEUX M., BOUCHON D., HÉCHARD Y., MOULIN L. (2014) : « First evidence of Amoebae-Mycobacteria association in drinking water network ». *Environ. Sci. Technol.* ; 48 : 11872-82.
- DELAFONT V., SAMBA-LOUAKA A., BOUCHON D., MOULIN L., HÉCHARD Y. (2015) : « Shedding light on microbial dark matter: a TM6 bacterium as natural endosymbiont of a free-living amoeba ». *Environ. Microbiol. Rep.* ; 7 : 970-8.
- DOUTERELO I., BOXALL J.B., DEINES P., SEKAR R., FISH K.E., BIGGS C.A. (2014) : « Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems ». *Water Res.* ; 65 : 134-56.
- DUPUY M., BERNE F., HERBELIN P., BINET M., BERTHELOT N., RODIER M.-H., et al. (2014) : « Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants ». *Int. J. Hyg. Environ. Health* ; 217 : 335-9.
- EDGAR R.C. (2004) : « MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput ». *Nucleic Acids Res.* ; 32 : 1792-7.
- EDGAR R.C. (2010) : « Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST ». *Bioinformatics* ; 26 : 2460-1.
- EDGAR R.C., HAAS B.J., CLEMENTE J.C., QUINCE C., KNIGHT R. (2011) : « UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection ». *Bioinformatics* ; 27 : 2194-200.
- FOUQUE E. (2013) : *Les processus de différenciation et la résistance des kystes aux traitements de désinfection chez l'amibe libre Vermamoeba vermiformis* [thèse]. Poitiers.
- FOUQUE E., TROUILHÉ M.-C., THOMAS V., HARTEMANN P., RODIER M.-H., HÉCHARD Y. (2012) : « Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae ». *Eukaryot. Cell* ; 11 : 382-7.
- GARCIA A., GOÑI P., CIELOSZYK J., FERNANDEZ M.T., CALVO-BEGUERÍA L., RUBIO E., et al. (2013) : « Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques ». *Environ. Sci. Technol.* ; 47 : 3132-40.
- GREUB G., RAOULT D. (2004) « Microorganisms resistant to free-living amoebae ». *Clin. Microbiol. Rev.* ; 17 : 413-33.
- HIJNEN W.A.M., BEERENDONK E.F., MEDEMA G.J. (2006) : « Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review ». *Water Res.* ; 40 : 3-22.
- HILLEBRANDT S., MÜLLER I. (1991) : « Repair of damage caused by UV- and X-irradiation in the amoeboflagellate *Naegleria gruberi* ». *Radiat. Environ. Biophys.* ; 30 : 123-30.
- HORN M., WAGNER M. (2004) : « Bacterial endosymbionts of free-living amoebae ». *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 51 : 509-14.
- ISBERG R.R., O'CONNOR T.J., HEIDTMAN M. (2009) : « The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells ». *Nat. Rev. Microbiol.* ; 7 : 13-24.
- LORET J.-F., GREUB G. (2010) : « Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment ». *Int. J. Hyg. Environ. Health* ; 213 : 167-75.
- MAGNET A., FENOY S., GALVÁN A.L., IZQUIERDO F., RUEDA C., FERNANDEZ VADILLO C., DEL AGUILA C. (2013) : « A year long study of the presence of free living amoeba in Spain ». *Water Res.* ; 47 : 6966-72.
- MARCIANO-CABRAL F., CABRAL G. (2003) : « *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans ». *Clin. Microbiol. Rev.* ; 16 : 273-307.
- MOLMERET M., HORN M., WAGNER M., SANTIC M., ABU KWAIK Y. (2005) : « Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens ». *Appl. Environ. Microbiol.* ; 71 : 20-8.
- NAUMOVA E.N., LISS A., JAGAI J.S., BEHLAU I., GRIFFITHS J.K. (2016) : « Hospitalizations due to selected infections caused by opportunistic plumbing pathogens (OPPP) and reported drug resistance in the United States older adult population in 1991-2006 ». *J. Public Health Policy* ; 37(4) : 500-13.
- OKSANEN J., BLANCHET F.G., KINDT R., LEGENDRE P., MINCHIN P.R., O'HARA R.B., et al. (2013) « Package 'vegan' ». *R Packag. ver. 2.0-8* : 254.
- PENLEY C.A., WILLIS S.W., SICKLER S.G. (1989) : « Comparative antimicrobial efficacy of soft and rigid gas permeable contact lens solutions against *Acanthamoeba* ». *CLAO J.* ; 15 : 257-60.
- PROCTOR C.R., HAMMES F. (2015) : « Drinking water microbiology – from measurement to management ». *Curr. Opin. Biotechnol.* ; 33 : 87-94.
- PRUESSE E., QUAST C., KNITTEL K., FUCHS B.M., LUDWIG W., PEPLIES J., GLÖCKNER F.O. (2007) : « SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB ». *Nucleic Acids Res.* ; 35 : 7188-96.
- ROBERTSON C.E., HARRIS J.K., WAGNER B.D., GRANGER D., BROWNE K., TATEM B., et al. (2013) : « Explicet: graphical user interface software for metadata-driven management, analysis and visualization of microbiome data ». *Bioinformatics* ; 29 : 3100-1.
- RODIER J., LEGUBE B., MERLET N. (2011) : *L'Analyse de l'eau* : Paris. Dunod.
- RODRÍGUEZ-ZARAGOZA S. (1994) : « Ecology of free-living amoebae ». *Crit. Rev. Microbiol.* ; 20 : 225-41.
- RODRÍGUEZ-ZARAGOZA S., RIVERA F., BONILLA P., RAMIREZ E., GALLEGOS E., CALDERON A., et al. (1993) « Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosi, SLP, Mexico ». *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* ; 3 Suppl 1 : 229-41.
- ROWBOTHAM T.J. (1980) : « Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae ». *J. Clin. Pathol.* ; 33 : 1179-83.

SHANAN S., ABD H., BAYOUMI M., SAEED A., SANDSTRÖM G. (2015) : « Prevalence of protozoa species in drinking and environmental water sources in Sudan ». *Biomed Res. Int.* ; 2015: Article ID 345619, 5 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/345619>

STANLEY S.M. (1973) : « An ecological theory for the sudden origin of multicellular life in the late precambrian ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* ; 70 : 1486-9.

STOREY M. V., WINIECKA-KRUSNELL J., ASHBOLT N.J., STENSTRÖM T.-A. (2004) : « The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae* ». *Scand. J. Infect. Dis.* ; 36 : 656-62.

THOMAS J.M., ASHBOLT N.J. (2011) : « Do free-living

amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? » *Environ. Sci. Technol.* ; 45 : 860-9.

THOMAS V., HERRERA-RIMANN K., BLANC D.S., GREUB G. (2006) : « Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network ». *Appl. Environ. Microbiol.* ; 72 : 2428-38.

THOMAS V., LORET J.-F., JOUSSET M., GREUB G. (2008) : « Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant ». *Environ. Microbiol.* ; 10 : 2728-45.

THOMAS V., MCDONNELL G., DENYER S.P., MAILLARD J.-Y. (2010) : « Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality ». *FEMS Microbiol. Rev.* ; 34 : 231-59.

## Résumé

**V. DELAFONT, D. BOUCHON, M. JOYEUX, Y. HÉCHARD, L. MOULIN**

### **Dynamique des populations amibiennes et de leur microbiome au sein d'un réseau d'eau potable**

Les amibes libres sont des micro-organismes eucaryotes omniprésents dans les réseaux d'eau naturels et anthropiques. Bien que les amibes libres soient rarement décrites comme directement pathogènes pour l'homme, elles sont considérées comme un réservoir permettant la persistance et la propagation de bactéries pathogènes et indésirables dans les réseaux d'eau. Ce constat justifie ainsi la nécessité de mieux comprendre la dynamique des populations amibiennes dans le contexte de l'approvisionnement en eau potable. Alors que leur présence dans les réseaux d'eau potable est largement documentée, l'écologie de ces micro-organismes dans ce type d'environnement reste à ce jour très peu

décrite. Sur la base d'une campagne de prélèvement d'eau couvrant le réseau d'eau potable de la ville de Paris, sur une période d'un an, la présence et la composition des communautés amibiennes, ainsi que l'ensemble des bactéries en association avec ces dernières (désignées comme leur microbiome) ont été caractérisés par pyroséquençage. La collection de divers paramètres physico-chimiques tels que l'origine de l'eau, la température, le pH et la concentration en chlore, a permis de mettre en évidence le fort impact de ces facteurs abiotiques dans la composition et la dynamique des communautés amibiennes omniprésentes au sein du réseau d'eau potable étudié.

## Abstract

**V. DELAFONT, D. BOUCHON, M. JOYEUX, Y. HÉCHARD, L. MOULIN**

### **Dynamics of free-living amoebae populations and their microbiome within a drinking water network**

Free-living amoebae are unicellular eukaryotes colonizing ubiquitously natural and man-made water systems. While most free-living amoebae are essentially harmless to humans, many widespread amoebae genera have been described as able to shelter potentially pathogenic bacteria, helping thus the protection and propagation of some of these unwanted bacterial pathogens in drinking water networks. Although the presence of free-living amoebae within drinking water networks is now well documented, their ecology in such environments

remain poorly explored. On the basis of a sampling campaign performed on Paris drinking water network, the presence as well as the community composition of both free-living amoebae and their associated bacteria (the so-called microbiome) were characterised using pyrosequencing. The simultaneous gathering and analysis of physicochemical parameters such as water origin, temperature, pH and chlorine concentration allowed us to put in evidence their strong impact on the ubiquitous free-living amoeba community.