

## Impact du lagunage et de l'épandage de déchets organiques sur la diffusion et l'évolution de bactéries pathogènes de l'homme

1- S. Nazaret, S. Favre-Bonté, Y. Richard, V. Rodriguez-Nava, R. Lavenir, C. Colinon, M. Neto, C. Pinot, A. Graindorge, S. Petit, E. Brothier, E. Borges, F. Maurin, C. Monnez, L. Villard, et B. Cournoyer<sup>1</sup>.

UMR5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, CNRS, et Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

2- P. Piveteau, E. Lyautey, JP. Lemaître, M. Lemunier, D. Garmyn, B. Pivato, G. Depret, et A. Hartmann. UMR 1229 Microbiologie et Géo chimie des Sols, INRA et Université de Bourgogne,

3- G. Bodineau, J.N. Rampon, et S. Houot. UMR 1091 INRA-AgroParisTech « Environnement et Grandes Cultures »

<sup>1</sup>courriel et adresse du coordinateur : [cournoye@biomserv.univ-lyon1.fr](mailto:cournoye@biomserv.univ-lyon1.fr), UMR5557 Ecologie Microbienne, 5<sup>e</sup> étage, Bât. Mendel, Campus de la Doua, Université Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex

Référence pour citation de l'article scientifique de synthèse :

Cournoyer, B., S. Nazaret, S. Favre-Bonté, Y. Richard, V. Rodriguez-Nava, R. Lavenir, C. Colinon, M. Neto, C. Pinot, A. Graindorge, S. Petit, E. Brothier, E. Borges, F. Maurin, C. Monnez, L. Villard, G. Bodineau, J.N. Rampon, E. Lyautey, JP. Lemaître, M. Lemunier, D. Garmyn, B. Pivato, G. Depret, P. Piveteau, S. Houot, A. Hartmann. 2009. Impact du lagunage et de l'épandage de déchets organiques sur la diffusion et l'évolution de bactéries pathogènes de l'homme. Article scientifique de synthèse. Projet ANR 2005-2008, SEST 009. Agence Nationale de la Recherche (ANR), programme Santé Environnement – Santé Travail (SEST), France.

### 1. Enjeux et objectifs

Notre projet de recherche répond à une demande sociétale forte pour des études approfondies sur les réservoirs environnementaux et sources d'agents pathogènes, et sur le comportement de ces agents au sein de ces milieux. Augmenter nos connaissances dans ce domaine pourrait permettre la mise en place d'actions préventives et une amélioration des pratiques ayant pour objectifs de réduire l'exposition des populations humaines aux agents pathogènes. Ces études permettent également de mieux comprendre les phénomènes d'émergence de variants génétiques (clones dominants ou épidémiques) chez les agents pathogènes bactériens.

L'originalité et le caractère innovant de ce projet reposent d'une part sur les questionnements scientifiques en pointe dans le domaine de l'écologie des agents pathogènes dont l'étude de leur dynamique évolutive et populationnelle dans l'environnement. D'autre part, ils reposent également sur le choix des modèles de microorganismes pathogènes. Les modèles de bactéries pathogènes sont complémentaires puisque certains sont considérés comme des agents pathogènes primaires i.e. *Listeria monocytogenes*, et d'autres comme des agents opportunistes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* et autres Bcc (*Burkholderia* du complexe *cepacia*), *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, *Nocardia*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Les premiers sont considérés invasifs et présentent des caractéristiques de virulence liées à la colonisation des cellules, les autres présentent des caractéristiques de virulence plus "indirectes" (synthèse de flagelles ou de pili, de toxines, aptitude à former des biofilms,...). Les espèces *A. hydrophila* et *P. aeruginosa* sont plutôt inféodées aux milieux hydriques, *B. cenocepacia* aux milieux sols (incluant la rhizosphère) et *L. monocytogenes* aux aliments et l'industrie agro-alimentaire. Des points forts de ce projet sont d'une part l'étude *in situ* des microorganismes pathogènes avec des dispositifs expérimentaux correspondant à des pratiques courantes de traitement des déchets (épandage de composts) et de leur valorisation en agriculture, et de traitement des eaux usées (lagunage), et, d'autre part, l'exhaustivité de la collecte des souches retrouvées au sein des environnements étudiés et l'analyse de leur patrimoine génétique.

Les objectifs de ce projet étaient:

- (1) Evaluer l'influence de deux pratiques de gestion des déchets (épandage de déchets organiques agricoles et urbains sur les terres agricoles, et le lagunage des eaux usées domestiques) sur la survie, multiplication et dispersion de bactéries pathogènes dans l'environnement,
- (2) Comparer la diversité génétique et métabolique des souches de ces agents pathogènes, issues de l'environnement, avec celle observée chez les souches cliniques communautaires ou de

l'environnement hospitalier. Une attention particulière a été portée aux propriétés de virulence et résistances aux antibiotiques.

## 2. Matériels et méthodes (incluant les nouveaux développements méthodologiques réalisés dans le cadre du projet)

### 2.1. Le site « Qualiagro » de Feucherolles – problématique compostage et épandage de déchets

Le dispositif agronomique « Qualiagro » situé à Feucherolles, a été mis en place en 1998, et vise à étudier l'intérêt agronomique de l'épandage de composts et son impact sur l'environnement. Le dispositif d'une superficie de 6 ha est localisé sur la commune d'Orgeval (Référence cadastrale ZA 98) à la limite avec la commune de Feucherolles dans les Yvelines.

Le dispositif (Figure 1) comprend 4 blocs de 10 parcelles correspondant à différents traitements. 5 traitements organiques sont croisés avec 2 niveaux de fertilisation azotée. Les 5 traitements organiques sont :

- un compost d'ordures ménagères résiduelles, **OMR** (ordures ménagères résiduelles après collecte sélective des emballages « propres et secs »)
- un compost de boues, **DVB** (co-compostage de déchets verts et/ou broyats de palettes et/ou rafles de maïs et de boues d'épuration urbaines)
- un compost de biodéchets ou fraction fermentescible des ordures ménagères, **BIO** (collecte sélective de cette fraction co-compostée avec des déchets verts)
- un fumier de bovins, amendement organique de référence (**FUM**)
- aucun amendement organique (témoin)

Le dispositif est cultivé selon une rotation blé-maïs. Les composts et le fumier sont principalement apportés tous les 2 ans, en fin d'été ou début d'automne, sur chaume de blé. Après épandage, la parcelle est déchaumée, ce qui permet d'enfouir les composts. Six épandages ont eu lieu : Octobre 1998 puis Septembre 2000, 2002, 2004, 2006 et 2007.

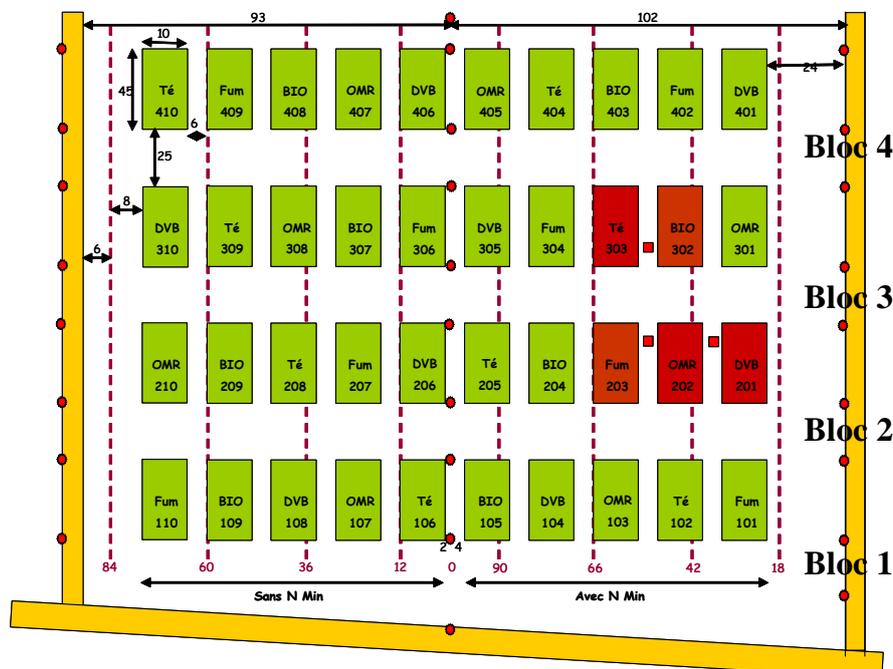


Figure 1. Plan du dispositif Qualiagro incluant 4 blocs de 10 parcelles. Les 5 parcelles équipées de lysimètre permettant de prélever des eaux d'infiltration, 45 cm sous l'horizon de surface, sont signalées en rouge.

## 2. 2. Lagunes d'assainissement des eaux usées domestiques (Ain)

Le lagunage naturel est particulièrement utilisé en Dombes (01) en raison de la présence de sols argileux. Ce système permet un abattement de l'azote global et du phosphore des eaux usées de l'ordre de 60 à 70%. Une lagune d'épuration est constituée de trois bassins (ou lagunes) (Figure 2) et d'un dégrillage (entrefer de 4 cm) en amont du premier bassin. L'alimentation en eaux usées est principalement gravitaire.

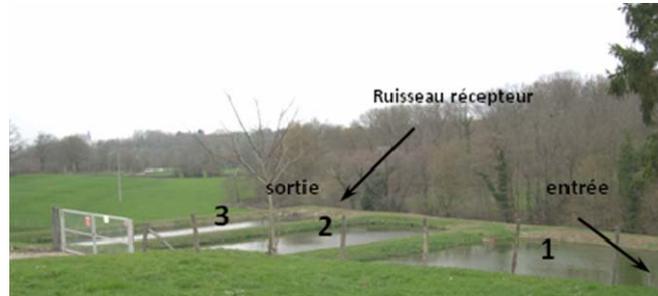


Figure 2. Lagune d'épuration modèle – Montracol (01). (1) le premier bassin (6 m<sup>2</sup>/EH), bassin d'entrée des eaux usées, est le siège prépondérant de l'abattement de la charge polluante carbonée. En sortie de ce bassin, la concentration en algues microscopiques peut être importante; (2) le deuxième bassin (2,5m<sup>2</sup>/EH) permet un abattement de l'azote, du phosphore et une réduction de la concentration en algues; (3) le troisième bassin (2,5 m<sup>2</sup>/EH) finalise le processus d'épuration. Il permet également de conserver une bonne qualité de traitement lors d'un incident (dysfonctionnement) ou d'une opération d'entretien (curage) survenant sur le premier bassin. Les eaux épurées (sortie) sont déversées dans un cours d'eau naturel (ruisseau).

## 2. 3. Echantillonnage des sites

Les informations concernant l'échantillonnage du site Qualiagro sont données dans le Tableau 1. Les échantillonnages de lagunes d'épuration ont été effectués en Octobre 2003, Janvier 2004, Mars 2004, Avril 2004, Février 2005, Octobre 2005 et Mai 2008. Les principaux points échantillonnés sont indiqués sur la Fig. 3

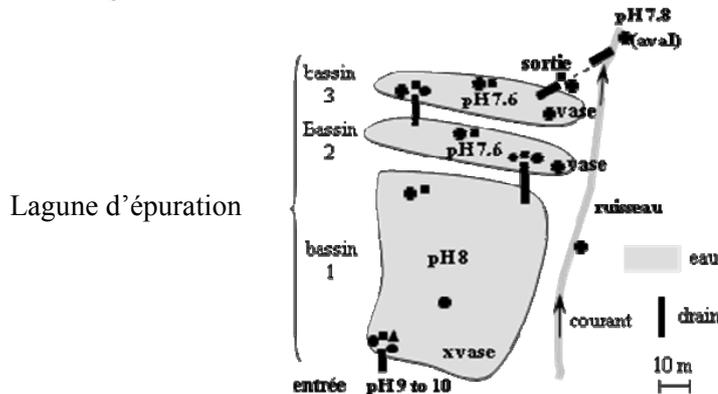


Figure 3. Schéma d'une lagune d'épuration avec position des zones échantillonnées. Vingt points supplémentaires ont été analysés en Octobre 2005 sur le site de Montracol et ont impliqué le prélèvement d'échantillons à deux profondeurs, -10 cm de la surface et +10 cm du fond, du bassin 1.

## 2. 4. Analyses microbiologiques par approches culturales

- *Listeria* spp.

Une méthode d'enrichissement a été utilisée impliquant un enrichissement de 25g de sols ou composts ou 25 mL d'eau dans 225 ml de milieu LEB à 30°C pendant 48h, suivi d'un deuxième enrichissement, 100 µl du premier enrichissement dans 10 ml de milieu UVM, à 35°C, 24h, puis d'un étalement de 50 ou 100 µl du deuxième enrichissement sur milieu PALCAM supplémenté avec 100 mg/l de cycloheximide (antifongique) et d'une incubation de 24h à 37°C.

- *Escherichia coli* et entérocoques intestinaux

La présence de souches d'*Escherichia coli* a été déterminée dans les sols par enrichissement sur eau peptonée tamponnée (EPT, AES Chemunex) et étalement sur milieu sélectif PTX ou TBX (Tergitol 7

Tableau 1. Echantillons prélevés pour analyse des bactéries pathogènes du site Qualiagro

Matrice	Date de prélèvement
<b>Sol</b>	
T0 : avant épandage	6 Septembre 2006
T1 : 1 mois après épandage	19 Octobre 2006
T2 : 4 mois après épandage	18 Janvier 2007
T3 : Récolte de l'orge	9 Juillet 2007
T4 : avant épandage	10 Septembre 2007
T5 : 1 mois après épandage	11 Octobre 2007
T6 : 4 mois après épandage	13 Décembre 2007
Composts	Septembre 2006 Septembre 2007
Eaux de la zone insaturée (-45 cm de la surface)	30 Novembre 2006 13 Décembre 2006 12 Janvier 2007 13 Février 2007 21 Février 2007 5 Mars 2007 28 Août 2007 5 Décembre 2007 21 Janvier 2008
Sol rhizosphérique + racines : orge	9 Juillet 2007
Sol rhizosphérique + racines : maïs	15 Octobre 2008

et coloration bleue pour les souches B-glucuronidase positive, AES Chemunex), les boîtes ont été incubées à 44°C pendant 24h. Les souches d'*Escherichia coli* ont été dénombrées dans les amendements par étalement direct sur le milieu TBX sans enrichissement selon la norme NF V08-53.

La norme NF T90-432 a été adaptée pour le dénombrement des entérocoques intestinaux à partir des échantillons de sols. 10g de sol ou d'amendement ont été mis en suspension dans 90 ml de TS (Tryptone sel) puis des dilutions en série au 1/10<sup>ème</sup> ont été réalisées dans du TS. 100 µl des dilutions appropriées ont été étalés sur milieu BEAA (Bile Esculine Azide Agar) Enterosel (AES Chemunex). Les boîtes ont été incubées pendant 24h à 44°C. Sur ce milieu, les entérocoques forment des colonies translucides entourées par un halo noir (esculinase +).

- *Pseudomonas aeruginosa*

Le milieu CAB/PAB (Cétrimide Agar Base) additionné d'acide nalidixique et d'un antifongique (la cycloheximide) a été utilisé. Après étalement de suspensions/dilutions de sol ou eaux usées, les boîtes ont été incubées de 24h à 72h à 28°C.

- *Aeromonas caviae* et *A. hydrophila*

Le milieu sélectif de Havelaar (Merck, Darmstadt, Allemagne) a été utilisé pour le dénombrement des *Aeromonas* spp. et l'isolement d' *A. caviae* et *A. hydrophila* à partir de suspensions/dilutions de sol ou eaux usées.

- *Stenotrophomonas maltophilia*

Les *S. maltophilia* ont été isolées de suspensions/dilutions de sols ou eaux étalées sur milieu VIA (Kerr *et al.*, 1996. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15:607-10).

- *Nocardia* spp.

Un gramme de sol a été dilué dans 9 ml de NaCl à 0.85%. Ensuite, le mélange a été chauffé 6 min à 55°C. Des dilutions de 10<sup>0</sup> à 10<sup>-6</sup> ont été étalées sur milieu Bennett et incubées à 22, 37 et 42 °C pendant 21 jours. Ce milieu a été supplémenté de deux antifongiques (cycloheximide à 50 µg/ml et nystatine à 10 000 UI) et un antibactérien (metacycline à 10 µg/ml).

- *Burkholderia* du *cepacia* complexe (Bcc)

Les suspensions/dilutions de sol ou eaux usées ont été étalées sur des milieux semi-sélectifs, le PCAT (*Pseudomonas cepacia*, Azelaic acid, Tryptamin) et le TB-T (Tryptan Blue, Tetracycline). Une méthode d'enrichissement, décrite par Graindorge et al. (2009) a également été utilisée.

### **2. 5. Manipulation des ADN et séquençage**

Ces méthodes sont décrites dans le bilan complet des travaux réalisés dans le cadre de ce projet ANR. Les séquençages d'ADN ont été effectués par la société Cogenics (Grenoble, France). La méthode de typage des souches de *P. aeruginosa* par électrophorèse en champ pulsé, après restriction des ADN totaux par l'enzyme *SpeI*, a été décrite dans Lavenir et al. 2008. Cette méthode a été utilisée pour les Bcc, sans modification. Elle a été adaptée pour les *Aeromonas* en effectuant une restriction des ADN totaux avec l'enzyme *XbaI*.

### **2. 6. Validation des colonies bactériennes**

- approches moléculaires

Des cribles PCR ont été utilisés ou développés pour valider l'identité des colonies bactériennes observées sur les milieux gélosés. Pour les *Listeria monocytogenes*, le crible PCR RFLP du gène *inlA*, codant pour le facteur de virulence *inlA*, a été utilisé (Rousseaux et al., 2004. Appl. Env. Microbiol. 70:2180-5). Pour *S. maltophilia*, la PCR spécifique d'espèce ciblant le gène codant l'ARNr 23S (SS-PCR, Whitby et al., 2000. J. Clin. Microbiol. 38:4305-9) a été utilisée mais un nouveau crible a été développé en raison de faux positifs liés à la proximité de l'espèce *S. rhizophila*. Pour *Nocardia*, la PCR discriminante au niveau du genre a été utilisée telle que décrite par Laurent et al. (1999. J. Clin. Microbiol. 37:99-102), et basée sur l'amplification d'un fragment de 600 pb du gène *rrs* (ARNr 16S). Pour *P. aeruginosa*, les Bcc, et les espèces *A. caviae* et *A. hydrophila*, de nouveaux cribles PCR ont dû être élaborés en raison d'un manque de spécificité des cribles disponibles. Ces cribles sont décrits dans le bilan complet des travaux réalisés dans le cadre de ce projet ANR.

- Approches phénotypiques

Les galeries API et le système VITEK2 de bio-Mérieux ont été utilisées pour valider l'identification de certaines bactéries, et obtenir les antibiogrammes des souches. De nombreux tests phénotypiques complémentaires ont été effectués et sont décrits dans le bilan complet des travaux réalisés dans le cadre de ce projet ANR.

### **2. 7. PCR quantitative**

Deux méthodes de PCR quantitative ont été mises au point et testées : 1- PCR quantitative avec un couple d'amorces spécifiques (détection avec Sybr Green, agent intercalant), 2- PCR quantitative avec un couple d'amorces spécifiques et une sonde spécifique fluorescente (type sonde TaqMan). Ces méthodes ont fait l'objet de mises au point importantes et sont décrites dans le bilan complet des travaux réalisés dans le cadre de ce projet ANR.

### **2. 8. Extraction d'ARN de *L. monocytogenes* EGD-e cultivé en extraits de sol**

Afin d'extraire efficacement les ARN, trois méthodes de lyse des cellules bactériennes ont été comparées : (i) broyage mécanique (FastPrep, MP Biomedicals, Illkirch Cedex, France), (ii) lyse enzymatique (lysozyme, SIGMA-ALDRICH, Saint-Quentin Fallavier, France) couplée au broyage mécanique et (iii) lyse au TriReagent (SIGMA-ALDRICH) couplée au broyage mécanique.

### **2. 9. Etude du protéome de *L. monocytogenes* cultivé en extraits de sol**

Les cellules bactériennes ont été lysées sous l'effet d'une pression élevée (2.5kb) à l'aide d'un disrupteur de cellules « one shot cell » (Constant Systems LTD). Les protéines cytosolubles ainsi libérées sont précipitées puis dosées (kit RCDC BioRad). Les analyses du protéome par électrophorèse bidimensionnelle et la caractérisation de spots protéiques d'intérêts ont été par la suite réalisées en collaboration avec Michel Hébraud à l'INRA de Clermont Ferrand-Theix (plateforme de protéomique). Cette équipe dispose des protéomes de *Listeria* cultivées sous différentes conditions et a également identifié de nombreux spots protéiques de ces protéomes (<http://www2.clermont.inra.fr/teome>).

### **2.10. Analyses phénotypiques par système Omnilog Combo.**

Ces analyses ont été effectuées selon les recommandations du fabricant du système Omnilog Combo (Biolog, USA). Ce système permet de tester les capacités métaboliques des bactéries en étudiant leur aptitude à utiliser plusieurs centaines de substrats pour leur croissance.

### **2.11. Analyse de la virulence des souches isolées**

Les potentiels de virulence ont été déduits par criblage PCR de gènes de virulence, hybridation avec sonde ADN spécifique de certains gènes de virulence ou par tests sur lignées cellulaires de type Caco-2.

### **2.12. Immunomagnéto-piégeage de *P. aeruginosa***

L'immunodétection par immunopiégeage avec des billes magnétiques (ou immunomagnétopiégeage) a été appliquée sur le modèle bactérien *P. aeruginosa* et la lagune d'épuration de Montracol. Cette technique implique la synthèse d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux ciblant spécifiquement l'ensemble des cellules de *P. aeruginosa*, les anticorps étant fixés sur des billes magnétiques. Cette approche est décrite dans le bilan complet des travaux réalisés dans le cadre de ce projet ANR.

### **2.13 Analyses physico-chimiques**

Des analyses physico-chimiques des constituants des sols et eaux du site Qualiagro, et eaux usées de la lagune d'épuration ont été effectuées selon les méthodes normalisées.

## **3. Résumé des principaux résultats et leur originalité**

Le premier objectif de ce projet était d'évaluer l'influence de deux pratiques de gestion des déchets (épandage de déchets organiques agricoles et urbains sur les terres agricoles, et le lagunage des eaux usées domestiques) sur la survie, multiplication et dispersion de bactéries pathogènes dans l'environnement. Cet objectif a été atteint. Nous avons apporté de multiples éléments à la compréhension des facteurs influençant la dissémination des agents pathogènes dans l'environnement via ces deux pratiques. Pour illustrer, nous avons pu observer une absence de populations significatives des formes cultivables de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Burkholderia* du complexe *cepacia* (Bcc) et d'*Aeromonas caviae* dans les sols sous culture d'orge et de maïs pour le site agricole de l'étude, en opposition à une forte abondance de l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia*, et à une détection d'espèces pathogènes de *Nocardia* et de *Listeria monocytogenes* dont des souches présentant un sérotype identique à celui de souches responsables de cas de listériose. De plus, nous avons pu observer que les composts et fumiers épandus sur le site agricole de cette étude présentaient des concentrations en entérocoques intestinaux et *Escherichia coli* proches des maxima réglementaires. Cependant, aucune corrélation significative entre les concentrations observées et les niveaux d'agents pathogènes n'a pu être observée. Outre ces bactéries indicatrices, le fumier de bovins a été trouvé comme présentant des concentrations significatives de *S. maltophilia*. De plus, il a été observé que les épandages de composts d'ordures ménagères grises semblent favorisés transitoirement une augmentation des effectifs des *S. maltophilia* des sols de la station expérimentale, et ceux de fumier de bovins une augmentation des *Nocardia* spp. Ces résultats nécessiteront, cependant, des validations par des approches plus fines telles que la PCR quantitative. Les composantes du sol sembleraient donc à l'origine de la contre-sélection de certaines espèces pathogènes, et certains amendements organiques augmenteraient les concentrations de certaines bactéries pathogènes (*S. maltophilia* et *Nocardia* spp.). En ce qui concerne les effets du lagunage des eaux usées sur les agents pathogènes bactériens, nous avons observé une bonne survie des espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, et d'espèces du Bcc dans ces systèmes. Les souches de lagunes d'*A. caviae* et *P. aeruginosa* ont montré des niveaux élevés de diversité infra-spécifique tandis que la diversité chez les Bcc a été jugée faible, suggérant une capacité d'acclimatation moindre à ce milieu. Ces travaux ont également permis d'observer des formes viables mais non-cultivables de ces bactéries dans les lagunes, suggérant que les abattements déduits par les approches cultivables seraient surestimés.

Le deuxième objectif de ce projet était d'évaluer la dangerosité des souches environnementales de ces bactéries pathogènes par analyses comparatives de leur diversité génétique et métabolique avec celle de souches cliniques communautaires ou de l'environnement hospitalier. Cet objectif a également été atteint. Les analyses comparatives de la diversité des souches environnementales et de souches cliniques ou hospitalières ont permis d'observer des clones ou groupes de souches communs, confirmant les dangers associés à la présence de ces bactéries dans l'environnement. De plus, nous avons pu montrer que la majorité des souches pathogènes isolées du site agricole Qualiagro et de la lagune d'épuration de Montracol possédait les potentialités génétiques suffisantes pour infecter l'homme. Les travaux de génétique évolutive ont, également, suggéré des effets sélectifs du milieu sur les *P. aeruginosa*, avec une émergence de clones dominants. Certains résultats ont suggéré que le lagunage des eaux usées pourrait favoriser les transferts horizontaux d'ADN et les réarrangements génétiques chez les *P. aeruginosa*.

#### 4. Faits marquants

- nouvelles méthodologies pour l'identification et le suivi de *P. aeruginosa*, les Bcc, *S. maltophilia*, et *L. monocytogenes*.
- l'épandage de déchets compostés sur le site agricole de cette étude a été uniquement à l'origine d'apports significatifs en entérocoques intestinaux et *E. coli*.
- le fumier de bovins présente une concentration significative en *S. maltophilia*
- les épandages de composts ou fumiers de bovins semblent induire une augmentation des concentrations en *S. maltophilia* et *Nocardia* dans les sols cultivés
- le lagunage des eaux usées semble propice à la survie voire la multiplication de nombreuses bactéries pathogènes
- le lagunage semble favoriser l'émergence de nouvelles configurations génétiques chez certaines bactéries pathogènes

#### 5. Perspectives

Nous devons aujourd'hui faire évoluer la problématique de l'écologie des agents infectieux vers des études *in situ* avec analyses des gènes exprimés, des fonctions réalisées par ces organismes dans les écosystèmes naturels, et vers des études des dynamiques spatio-temporelles de ces micro-organismes. Nous devons également mieux définir les sources responsables de la présence de ces organismes dans les milieux naturels. Seules ces informations permettront d'envisager des approches d'ingénierie écologique pouvant limiter la diffusion des agents pathogènes et l'exposition des populations humaines. Nous nous heurtons cependant, aujourd'hui, à des verrous technologiques notamment l'analyse de faibles quantités d'ADN, ARNm et protéines extraits des bactéries pathogènes en milieu naturel, rendant difficile leur détection et les enquêtes de terrain permettant d'identifier les sources à l'origine de leur présence.

Cependant, l'écologie microbienne a subi, depuis quelques années, une mutation importante et favorable aux analyses *in situ* des processus de structuration des peuplements et populations bactériens. Cette mutation est liée en grande partie à certains développements technologiques dont le séquençage « à haut débit » des génomes et méta-génomes bactériens, permettant l'accès à la diversité cachée des micro-organismes et à leur forme viable mais non-cultivable, et les puces à ADN, permettant la réalisation de bilan de groupes taxonomiques retrouvés au sein de certains biotopes ou bien d'étudier globalement l'expression des génomes. Le domaine de l'écologie microbienne entre donc aujourd'hui dans une nouvelle ère avec des approches plus intégratives (n'occultant plus les problèmes de diversité spécifique et infra-spécifique) visant à mieux comprendre la structuration des peuplements et populations bactériens dans divers écosystèmes, et à identifier les règles et processus les structurant. Dans le cadre d'un nouveau projet ANR (programme CES), intitulé INVASION, nous initierons des travaux dans cette direction en effectuant un bilan, par analyse méta-génomique, des contaminants microbiens introduits en rivière par l'intermédiaire des systèmes de déversoir d'orage (rejet d'eaux usées par temps de pluie).

## 6. Retombées

De nombreux résultats originaux ont été obtenus donnant la possibilité d'une diffusion des travaux sous la forme d'articles scientifiques à comité de lecture. Plus de 15 articles scientifiques à comité de lecture devraient être publiés grâce, en totalité ou en partie, au financement ANR de ce projet. Ces travaux auront un impact significatif dans le domaine santé-environnement. Ils permettent une nouvelle appréciation des sources et facteurs à l'origine de la présence ou de l'émergence de certains clones épidémiques bactériens, où l'environnement jouerait le rôle d'un réservoir d'innovations génétiques en raison de probables échanges génétiques entre agents pathogènes bactériens et autres composantes des peuplements bactériens mais également en raison des stress induits chez ces bactéries provoquant une plus grande instabilité génétique, favorable à la génération de diversité.

Ces travaux seront une source d'informations importante pour les agences de veille sanitaire (AFSSA et AFSSET).

## 7. Les principales publications obtenues

### Articles scientifiques internationaux à comité de lecture:

1. Lavenir, R., S. Petit, S. Favre-Bonté, F. Laurent, S. Nazaret and B. Cournoyer. *Pseudomonas aeruginosa* in wastewater treatment lagoons: selection of *lasR* mutations and evidence of *exoU* acquisitions. (en cours de soumission)
2. Colinet, C., D. Jocktane, E. Brothier, G. M. Rossolini, B. Cournoyer, and S. Nazaret. Snakes as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance gene cassettes. *Env. Microbiol.* (accepté)
3. Lavenir et al. Genetic structure of a *Pseudomonas aeruginosa* wastewater treatment lagoon population. (en cours de rédaction)
4. Graindorge, A., A. Menard, M. Neto, C. Bouvet, R. Miollan, S. Gaillard, H. de Montclos, F. Laurent, and B. Cournoyer. Epidemiology and molecular characterization of a *Burkholderia cenocepacia* clone responsible of nosocomial pulmonary tract infections in a French ICU. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (sous-presse)
5. Doléans-Jordheim, A., B. Cournoyer, E. Bergeron, J. Croizé, H. Salord, J. André, M.-A. Mazoyer, F. N. R. Renaud, and J. Freney. 2009. Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotypings in various epidemiological situations. *European Journal of Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28(9):1105-11
6. Nazaret, S., F. Assade, E. Brothier, A. M. Freydière, G. Bellon, and B. Cournoyer. 2009. RISA-HPLC analysis of lung bacterial colonizers of cystic fibrosis children. *J. Microbiol. Methods* 76(1):58-69
7. Lavenir, R., M. Sanroma, S. Gibert, O. Crouzet, F. Laurent, J. Kravtsoff, M.-A. Mazoyer, and B. Cournoyer. 2008. Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *J. Appl. Microbiol.* 105: 1491-1501
8. Govindarajan, M., J. Balandreau, S. W. Kwon, H. Y. Weon, and C. Lakshminarasimhan. 2008. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microb. Ecol.* 55(1): 21-37.
9. Menard, A., P. Estrada de Los Santos, A. Graindorge, and B. Cournoyer. 2007. Architecture of *Burkholderia cepacia* complex sigma 70 gene family: evidence of alternative primary and clade-specific factors, and genomic instability. *BMC Genomics.* 8(1):308
10. Menard, A., C. Monnez, P. Estrada de los Santos, C. Segonds, J. Caballero-Mellado, J. J. LiPuma, G. Chabanon, and B. Cournoyer. 2007. Selection of nitrogen-fixing deficient *Burkholderia vietnamiensis* strains by cystic fibrosis patients: involvement of *nif* gene deletions and auxotrophic mutations. *Env. Microbiol.* 9:1176-85.

11. Lavenir, R., D. Jocktane, F. Laurent, S. Nazaret, and B. Cournoyer. 2007. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. J Microbiol Methods. Jul;70(1):20-9.
12. Lyautey E., D. Lapen, G. Wilkes, K. McCleary, H. Hartmann, P. Piveteau, A. Rieu, W. Robertson, D. Medeiros, T. Edge, V. Gannon, and E. Topp. 2007. Distribution and Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated From Surface Waters of a Mixed-Activity Watershed. Appl. Env. Microbiol. 73 : 5401-5410
13. Lyautey, E., A. Hartmann, F. Pagotto, K. Tyler, D. R. Lapen, G. Wilkes, P. Piveteau, A. Rieu, W. J. Robertson, D. T. Medeiros, T. A. Edge, V. Gannon, and E. Topp. 2007. Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. Canadian Journal of Microbiology. 53: 1158-1167.
14. Rodriguez-Nava, V., A. Couble, G. Devulder, J.-P. Flandrois, P. Boiron, and F. Laurent. 2006. Use of PCR-Restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for hsp65 gene-based identification of Nocardia species. J. Clin. Microbiol. 44 (2): 536-546
15. Maron P. A., H. Schimann, L. Ranjard, E. Brothier, A. M. Domenach, R. Lensi, and S. Nazaret 2006. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. European J. Soil Biol. 42 (2): 65-73

### **Rapports scientifiques - stage M2 recherche et autres**

1. Chatelard, C. 2006. *Aeromonas caviae* : facteurs de pathogénicité des souches d'origines cliniques et environnementales et capacité de survie dans diverses eaux. Master Ecologie Microbienne. Université Lyon 1.
2. Lazar, C. 2006. Diversité infra-spécifique des gènes *nirS* et activité dénitrifiante chez l'espèce pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. Master Ecologie Microbienne. Université Lyon 1.
3. Rullière, C. (2006). Recherche et caractérisation de *Listeria spp.* dans un sol amendé par des composts d'origine urbaine. Rapport de stage de DUT Génie biologique, option Agronomie. IUT, Dijon.43 p.
4. Laurent, J. (2006). Etude de la survie de *Listeria monocytogenes* dans différents sols français (programme RMQS). Rapport de stage de 1ère année de Master M1 Sciences, Technologies, Santé. Mention Qualité des Aliments. Université de Bourgogne, Dijon.15 p.
5. Pinot, C. 2007. Pratique agricole et diffusion de germes pathogènes opportunistes : le cas de *Stenotrophomonas maltophilia*. Master Ecologie Microbienne. Université Lyon 1.
6. Petit, S. 2008. Mutations adaptatives chez les *Pseudomonas aeruginosa* d'un milieu hydrique : reproductibilité et spécificités du phénomène
7. Chernine, S. 2008. Etude du risque infectieux et du danger associés aux souches d'*Aeromonas hydrophila* d'origine environnementale. Master Ecologie Microbienne. Université Lyon 1.
8. Lopez, E. (2008). Développement de l'immunopiegeage avec séparation magnétique pour la détection d'agents pathogènes opportunistes dans l'environnement: application à *Pseudomonas aeruginosa*. Rapport de stage de DUT Génie biologique, option ABB. IUT, Université Claude Bernard Lyon1. 24p.
9. Blanchard, L. (2009). Résistance aux éléments traces métalliques et aux antibiotiques chez les *Stenotrophomonas maltophilia* des sols. Master Ecologie Microbienne. Université Lyon 1.

### **Thèses de doctorat en science**

1. Menard, A. 2006. Génétique évolutive de l'adaptation aux contraintes environnementales chez les *Burkholderia* du complexe *cepacia*, cas de la famille des facteurs transcriptionnels  $\sigma_{70}$ , de la fixation d'azote et des séquences d'insertion. Thèse de doctorat en science, Université Lyon 1.

2. Lavenir, R. 2007. Lagunage des eaux usées et risques infectieux : le cas de *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat en science, Université Lyon 1.
3. Jocktane, D. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* dans l'environnement: distribution, niveau populationnel et effet sur l'organisation des communautés microbiennes. Thèse de doctorat en science, Université Lyon 1.
4. Graindorge, A. 2009. Le clone épidémique Bourg-en-Bresse de l'espèce *Burkholderia cenocepacia* : origine, positionnement phylétique et phénomènes génétiques liés à son émergence. Thèse de doctorat en science, Université Lyon 1.

## 8. Remerciements

Nous remercions M. Poitrenaud et P. Gourland du Centre de Recherche sur la Propreté - Veolia Environnement, pour les aides apportées au maintien du site Qualiagro de Feucherolles. Nous tenons à remercier la mairie de la commune de Montracol pour avoir autorisé l'accès à sa lagune d'épuration.

Nous tenons à souligner les contributions significatives de nombreux collaborateurs du milieu hospitalier dont F. Laurent, Anne-Marie Freydière, Marie-Andrée Mazoyer, H. de Montclos, JP Flandrois, J. Freney, A. Doléans, et G. Bellon.

Nous tenons à souligner les contributions significatives de J. Cabellaro-Mellado (Mexique), JJ LiPuma (USA), E. Topp (Canada), M. Hébraud (France), A. Kodjo (France), G. Chabanon et C. Segonds (France).

Nous tenons à remercier le CNRS, l'INRA, l'ENVL, les Universités de Bourgogne et Lyon 1, ainsi que l'AFSSET, la région Rhône-Alpes, le Conseil Régional de Bourgogne, le Centre de Recherche sur la Propreté - Veolia Environnement, pour les soutiens financiers complémentaires qui ont été attribués à ce projet. Ces soutiens ont permis, entre autre, l'achat de matériels et le financement d'allocations doctorales et post-doctorales.