



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Sébastien BONOT

Persistance et dissémination du plasmide pB10, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines

Le 2 juillet 2010

Membres du jury :

Rapporteurs : Fabienne PETIT

**Professeur, Laboratoire m2c UMR 6143 CNRS-
Université de Rouen, Mont Saint Aignan**

Pascal SIMONET

**Docteur, Laboratoire AMPERE UMR 5005 CNRS-
Ecole centrale de Lyon, Ecully**

Examineurs : Sophie COURTOIS

Docteur, CIRSEE – Suez Environnement, Le Pecq

Pierre LEBLOND

**Professeur, LGE UMR 1128 INRA- Université Henri
Poincaré, Vandoeuvre-lès-Nancy**

Jean Claude BLOCK

**Professeur, Directeur de Thèse, LCPME UMR 7564
CNRS- Université Henri Poincaré, Villers-lès-Nancy**

Christophe MERLIN

**Docteur, Co-directeur de thèse, LCPME UMR 7564
CNRS- Université Henri Poincaré, Vandoeuvre-lès-
Nancy**

**Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564
CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy-Université, 405, rue de Vandoeuvre 54600
Villers-lès-Nancy**

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Sébastien BONOT

Persistance et dissémination du plasmide pB10, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines

Le 2 juillet 2010

Membres du jury :

Rapporteurs : Fabienne PETIT

**Professeur, Laboratoire m2c UMR 6143 CNRS-
Université de Rouen, Mont Saint Aignan**

Pascal SIMONET

**Docteur, Laboratoire AMPERE UMR 5005 CNRS-
Ecole centrale de Lyon, Ecully**

Examineurs : Sophie COURTOIS

Docteur, CIRSEE – Suez Environnement, Le Pecq

Pierre LEBLOND

**Professeur, LGE UMR 1128 INRA- Université Henri
Poincaré, Vandoeuvre-lès-Nancy**

Jean Claude BLOCK

**Professeur, Directeur de Thèse, LCPME UMR 7564
CNRS- Université Henri Poincaré, Villers-lès-Nancy**

Christophe MERLIN

**Docteur, Co-directeur de thèse, LCPME UMR 7564
CNRS- Université Henri Poincaré, Vandoeuvre-lès-
Nancy**

**Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564
CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy-Université, 405, rue de Vandoeuvre 54600
Villers-lès-Nancy**

Titre : Persistance et dissémination du plasmide pB10, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses bactériennes issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines.

Résumé :

L'utilisation massive des antibiotiques, depuis les années 50, génère une libération importante de ces molécules dans l'environnement (excrétion via les urines et les fèces) que l'on peut retrouver à des concentrations allant de 1 à 100 ng/L dans les eaux usées urbaines. Parce qu'elle réunit microorganismes résistants et antibiotiques, la station d'épuration d'eaux usées urbaines pourrait être une zone propice au transfert des gènes de résistance. Cependant, avec sa position stratégique à l'interface entre les activités humaines et l'environnement, la station d'épuration pourrait constituer un « rempart » contribuant à limiter leur dissémination dans l'environnement.

Les paramètres qui influencent ces transferts dans les stations d'épuration sont encore mal connus, en particulier du fait de limitations méthodologiques. Aussi l'objectif de notre travail était de déterminer les facteurs environnementaux influant sur la stabilité et le transfert d'un élément génétique mobile modèle, le plasmide pB10, dans des communautés bactériennes (biomasses de stations d'épuration et sédiments de rivière) maintenues en microcosmes. Jusqu'à présent, les transferts de gènes de résistance ont été principalement étudiés avec des méthodes reposant sur la culture de microorganismes sur milieux sélectifs, dont nous savons aujourd'hui qu'elles sous-estiment les phénomènes observés. Aussi, nous avons élaboré une approche basée sur la PCR quantitative pour détecter la dissémination d'un ADN mobile modèle amené via une bactérie hôte *E. coli* DH5 α . Les couples amorces/sondes très spécifiques ont pu être élaborés en tirant profit de la structure mosaïque du génome bactérien. L'approche proposée repose sur des mesures comparées du nombre de plasmide pB10 et de son hôte bactérien DH5 α au cours du temps, où une augmentation du rapport (pB10/DH5 α) implique une dissémination du plasmide vers les bactéries indigènes. Outre l'intérêt du développement méthodologique proposé, cette méthode a permis d'évaluer l'incidence de quelques paramètres environnementaux sur la dissémination d'un ADN au sein de communautés microbiennes complexes. Deux groupes de facteurs ont pu être distingués selon qu'ils influencent la persistance du plasmide pB10 dans les communautés dans son hôte initial (oxygénation/brassage, ajout d'antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices comme l'amoxicilline et le sulfaméthoxazole fréquemment retrouvés en station d'épuration) ou/et qu'ils favorisent sa dissémination dans les communautés bactériennes (biofilms, sédiments). Sans induire de transferts génétiques, les antibiotiques testés, même en concentrations sub-létales, pourraient participer à la dissémination de gènes de résistance en favorisant leur persistance.

Mots clés : antibiotiques, gènes de résistance, transferts horizontaux, stations d'épuration d'eaux usées urbaines, sédiments de rivière, PCR quantitative, plasmide pB10.

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement UMR 7564
405, rue de Vandoeuvre
54600 Villers-lès-Nancy

Title : Persistence and dissemination of the pB10 plasmid , vector of antibiotics resistance genes, in bacterial biomass from urban wastewater treatment plant.

Summary :

The widespread use of antibiotics since the 50s, generates a significant release of these molecules in the environment (excretion via urine and feces) which can be found at concentrations ranging from 1-100 ng/L in wastewater. Due to the high microbial biomass and the abundance of nutrients, wastewater treatment plants (WWTP) represent a suitable habitat for horizontal gene transfer. Because they occupy a key position between human activities and the environment, WWTP may play a major role in limiting the dissemination of antibiotic resistance genes, therefore contributing to the preservation. The parameters which influence these transfers in wastewater treatment plants are still poorly known, especially because of methodological limitations. Therefore the aim of our study was to identify environmental factors affecting the stability and transfer of a mobile genetic element model, the plasmid pB10 in bacterial communities (biomass from wastewater treatment plants and river sediments) maintained in microcosms. So far, the transfer of resistance genes have been studied mainly with methods based on the cultivation of microorganisms on selective media that we know now they underestimate the observed phenomena. Also, an approach based on quantitative PCR was developed for detecting the release of a mobile DNA template from the host bacterium *E. coli* DH5 α . Couples of designed primers/probes were very specific and have been developed by taking advantage of the mosaic structure of the bacterial genome. The proposed approach is based on the over time measurements of the number of plasmids pB10 and its bacterial host DH5 α , where an increased ratio (pB10/DH5 α) implies a release of the plasmid to the indigenous bacteria. This method was used to assess the impact of some environmental parameters on the release of DNA in complex microbial communities. Two groups of factors could be distinguished according to whether they influence the persistence of plasmid pB10 in communities in microcosms (oxygenation / mixing, addition of antibiotics at sub-inhibitory concentrations as amoxicillin and sulfamethoxazole frequently found in treatment plant) and / or they favor his release in bacterial communities (biofilms, sediments). Without inducing genes transfers, the antibiotics tested, even at sub-lethal concentrations, could participate in the dissemination of resistance genes by facilitating their persistence.

Keywords : Antibiotics, resistance genes, horizontal transfers, wastewater treatment plant, river sediments, quantitative PCR, pB10 plasmid.

Quelques mots à vous...

Quatre ans que nous partîmes à la conquête d'un nouveau monde, nous revîmes à port les calles chargées de trésors. Vision naïve dont certains diront même qu'elle pourrait tenir du rêve ou plutôt de la folie. Mais rêve et folie ne sont-ils pas les bagages nécessaires pour s'offrir à la « Recherche » ?

Effectivement... Ces remerciements auraient pu débiter ainsi... Ou bien encore comme ceci :

J'aurais voulu être pape (oui autant l'avouer de toute façon quelqu'un aurait fini par vendre la mèche) les dorures, les palais, le pouvoir allez savoir. Et si tous les chemins mènent à Rome, le mien m'a mené au laboratoire... Et me voici chercheur... J'ai testé ça aussi ...

Alors j'avais aussi songé à ...

- Sébastien bonjour*
- Bonjour !*
- Alors nous sommes ici pour parler de votre euuuuh...*
- De mon écrit, appelons le comme cela... Mon écrit.*
- De votre écrit donc... Alors je dois vous avouer que je n'ai pas tout lu parce que je n'ai pas tout compris... Mais comment vous est venue cette idée ? Ce n'est pourtant pas courant un tel roman.*
- Sans doute parce que ça n'en est pas un sinon il aurait débuté plutôt comme ceci : Quatre ans... Partis à la conquête d'un nouveau monde, nous revîmes à port les calles chargées de trésors. Vision naïve dont certains diront même qu'elle pourrait tenir de la folie mais au final, tout comme le rêve, n'en faut-il pas pour jouer de la Recherche.*
- La Recherche ?*
- Oui... C'est une thèse...*
- Je comprends mieux*

Mais je ne savais plus où vraiment cela me mènerait... J'aurai donc testé différentes versions, pléthores d'introductions pour en venir à cette conclusion que d'aucune ne me plaisait réellement. Il est donc précisément 00 : 59, un matin de janvier et je m'apprête à écrire ce qui sera les premières lignes que vous allez lire. Celles-là même qui au final et selon quelques mauvaises langues risquent de vous amener à considérer que je suis probablement affecté de folie.

Il est toujours fort délicat de se lancer dans une liste de remerciements avec le souci de ne pas froisser les sensibilités de chacun, selon son rang dans la succession des noms, ou pire encore en oubliant des noms. Je vais donc m'y risquer mais avec rapidité et sans je vous l'avoue exhaustivité.

Honneurs aux dames, je vais donc commencer par toi Sophie. Il est toujours fort agréable de côtoyer le dynamisme l'optimisme et l'esprit critique, précieuses qualités dont tu as fait preuve tout au long de ces 3 ans. Au-delà de cela c'est aussi la personnalité que j'ai fortement apprécié. L'une n'allant pas sans l'autre... Merci à toi Zdravka ... Bon goût et chercheur ne sont pas un paradoxe et tu en es l'assertorisme. Bien évidemment je ne peux pas réduire tes qualités à un physique et ça ne serait d'ailleurs que méprise. À travers vous c'est bien l'ensemble des gens avec qui j'ai pu travailler au CIRSEE que je tiens à remercier dont deux plus particulièrement encore Michèle et Sylvie...

De Paris à Nancy, il n'y a finalement plus qu'une petite ballade en TGV. LCPME mon amour me voici donc. Cher Christophe (CC ... Oui pour une fois ça change), je ne peux que dire que j'envie et aspire à un jour pouvoir prétendre à un niveau scientifique proche du tien et je ne peux que finalement me réjouir d'avoir bénéficié de cette manne. À toi Jean Claude c'est bien

cette empathie, rehaussée parfois de « cinglance » et ce vif esprit d'analyse que je garde en tête.

Je ne serais pas exhaustif et le listing de noms ponctués de virgules me paraît trop ressembler à un souchier pour que j'eusse envie de m'y plier. Je vais donc simplement dire que je remercie alors l'ensemble des gens avec qui j'aurai pu avoir ne serait ce qu'un contact visuel mais ponctué d'un sourire au cours de cette aventure. Notons donc ce mélange : une poignée de maîtres de conf, saupoudrée de deux doigts de post-docs, accompagnée d'un plat de thésards, le tout rehaussé d'une pincée de stagiaires et décoré d'une technicienne... aura suffi à un fabuleux cocktail.

Et bien évidemment, de nombreux sont devenus des amis. Ah!!! Mes amis justement c'est donc bien à vous que je pense si je dois dire merci. À moins que ça ne soit à ma famille. Mais finalement amis... Famille, famille... Amis j'avoue ne plus faire de différence. Toujours est-il que comme dit la poète « ma plus belle histoire d'amour c'est vous ». Vous êtes ma fierté... Aussi c'est à vous que j'ai envie de consacrer la plus large place de ces remerciements après m'avoir supporté pendant 3 ans (et bien plus) où (trop) passionné par mon sujet, je vous ai souvent rebattu les oreilles avec tout ça... Mais alors ceci achevé que vais-je donc bien devenir ? À n'en point douter votre ami invariablement je resterai... Pour le reste, chacun a sa vision comme vous avez pu l'exprimer. Constatez que même si vous êtes peu à me voir chercheur j'ai malheureusement le regret de vous apprendre qu'il vous faudra vous y faire.

Que seraient ces remerciements sans une séquence « hommage familial » ? Je n'aurais pas pensé, il y a quelques années pouvoir affirmer que je me sentais si proche de vous. Joyeuse tribu dont la génération nouvelle est digne du plus grand spectacle de cirque, c'est l'effervescence même que vous donnez au quotidien qui m'attache tant à vous. Voici cependant un extrait choisi que je ne résiste pas de vous mettre en partage. La question : « je fais quoi comme travail au fait? »... Le débat était lancé...

- Noé / 2 ans et demi : « Tais-toi minus ! »

- Eliot / 4 ans : « Tu soignes des microbes ! »

- Axelle / 7 ans : « Mais non ! Il élève des microbes »

- Gaby / 10 ans : « N'importe quoi ! Il travaille dans un labo »

À tous, bon vent... À mes plus proches : Il vous faudra me supporter encore longtemps et sans changements !!!

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
Amx	Amoxicilline
Azi	Azithromycine
Cli	Clindamycine
Clr	Clarithromycine
Cm	Chloramphénicol
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
Cp	Céphalosoprine
DCO	Demande Chimique en Oxygène
ds-red	disconoma's red fluorescent protein
FAM	6-carboxyfluorescéine
gfp	green fluorescent protein
IB	Indice de Boue
ICE	Integrative and Conjugative Elements
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactoside
kb	kilobases
Km	Kanamycine
LB	Luria Bertani
Lm	Lincomycine
MES	Matières en Suspension
MVS	Matières Volatiles en Suspension
Nal	Acide nalidixique
Nm	Néomycine
Nor	Norfloxacin
Nour	Nourséothricine sulfate
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen G	Pénicilline G
q-PCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
rfp	red fluorescent protein
Rif	Rifampicine
Rox	Roxithromycine
Sp	Spectinomycine
STEP	Station d'épuration
Str	Streptomycine
Sulf	Sulfamides
TAMRA	6-carboxytétraméthylrhodamine
Tet	Tétracycline
Tm	Triméthoprime
Tyl	Tylosine
UFC	Unité Formant Colonie
V30	Volume de sédimentation à 30 minutes
VNC	Viable Non Cultivable

Table des matières

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. Les transferts de gènes horizontaux : principaux mécanismes	9
1. La transformation bactérienne	10
2. La transduction	11
3. Transposons et intégrons	12
4. La conjugaison	13
II. Les outils d'étude des gènes de résistance aux antibiotiques et du transfert	14
III. Les principaux paramètres environnementaux qui influent sur les transferts de gènes	18
IV. Les antibiotiques comme pression de transfert	20
1. Définition et propriétés	20
2. Effets des antibiotiques sur les bactéries : l'hormésie	22
3. Effets des antibiotiques sur les transferts de gènes de résistance	25
V. Antibiotiques : consommation et devenir en station d'épuration	26
1. Consommation en médecine humaine	26
2. Devenir en station d'épuration	27
PARTIE II : MATERIELS ET METHODES	31
I. Cultures bactériennes et conjugaisons	33
1. Culture des souches bactériennes et milieux de croissance	33
2. Dénombrement bactérien et évaluation de la sensibilité aux antibiotiques	34
3. Cinétique de croissance bactérienne en milieu liquide	34
4. Conjugaisons bactériennes	35
4.1. Conjugaisons sur boîte	35
4.2. Conjugaisons « sur filtre »	35
5. Inductibilité de la fluorescence codée par les plasmides pB10::mini-Tn5- <i>gfp</i>	36

II. Origines et échantillonnage des matrices environnementales pour les expérimentations en microcosmes	36
1. Boues de station d'épuration	36
1.1. Origines et échantillonnage	36
1.2. Caractérisation physico-chimique des boues prélevées	38
2. Sédiments de rivière	41
2.1. Origines et échantillonnage	41
2.2. Caractérisation physico-chimique des sédiments	42
III. Montage et opération de microcosmes	43
1. Microcosmes de boues biologiques	43
2. Microcosmes Procédé Kaldnes®	45
3. Microcosmes de boues anaérobies	46
4. Microcosmes de sédiments de rivières	46
5. Inoculation des microcosmes	48
6. Prélèvements et conditionnement des échantillons en microcosmes	48
IV. Extraction et purification de l'ADN total	49
1. Techniques d'extraction et de purification sélectionnées	49
2. Evaluation de la concentration et de la pureté des ADN extraits	50
3. Evaluation de la fragmentation des ADN extraits	50
V. Biologie moléculaire	51
1. Extraction d'ADN	51
1.1. Extraction d'ADN chromosomique de culture bactérienne pure	51
1.2. Extraction d'ADN plasmidique de culture bactérienne pure	51
2. Digestions enzymatiques	51
3. Conditions de PCR quantitative	51
4. Conditions de PCR quantitative	52
5. Développement d'amorces et de sondes spécifiques pour DH5α et pB10	52
5.1. Recherche de séquences spécifiques par analyse en BLAST	52
5.2. Élaboration d'amorces et de sondes par bioinformatique	53
5.3. Gamme étalon, contrôles négatifs et contrôles d'inhibition	54

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	55
Chapitre I : Suivi de transfert de pB10 par microscopie à épifluorescence	57
I. Choix du plasmide pB10 comme modèle d'étude	59
II. Transfert de pB10 en boues de STEP : suivi par microscopie à épifluorescence	62
1. Construction de plasmides pB10::mini-Tn5- <i>gfp</i>	63
2. Localisation des insertions du transposon mini-Tn5- <i>gfp</i> sur la structure de pB10 dans les différents clones isolés	65
3. Influence de l'insertion du transposon mini-Tn5- <i>gfp</i> sur les propriétés du plasmide pB10 et la physiologie de sa cellule hôte	67
3.1. Transformation de différentes espèces bactériennes	68
3.2. Effet de l'insertion sur les profils de résistance antibiotique du plasmide pB10	68
3.3. Impact des insertions sur la physiologie de la cellule hôte	69
3.4. Inductibilité de la fluorescence codée par le plasmide pB10 :: <i>gfp</i> -1 chez <i>E. coli</i>	72
3.5. Inductibilité de la fluorescence contrôlée par le variant <i>lacI^q</i>	73
4. Étude la faisabilité de la mesure de fluorescence	77
III. Conclusion	78
Chapitre II : Suivi de transfert de pB10 par PCR quantitative	79
I. Sélection d'une méthode d'extraction et de purification d'ADN total de boues de STEP	81
II. Développement d'une méthode de détection et quantification des transferts de pB10 dans les communautés bactériennes environnementales par q-PCR	85
1. Élaboration d'amorces/sondes spécifiques pour la détection de pB10 et DH5α par q-PCR	85
1.1. Identification de séquences	85

1.2. Identification de séquences cibles pour la détection spécifique de DH5 α	88
2. Spécificité des couples d'amorces pour pB10 et DH5 α	89
3. Efficacité de PCR des différentes combinaisons sonde/amorces	90
3.1. Efficacité de PCR des combinaisons sonde/amorce pour la détection de pB10	90
3.2. Efficacité des combinaisons sonde/amorces pour la détection de DH5 α	93
4. Optimisation des conditions de q-PCR avec les couples	94
4. 1. Optimisation des conditions de q-PCR pour la détection de pB10	94
4.1.1. Détermination des concentrations optimales d'amorces pour la détection de pB10	94
4.1.2. Détermination de la concentration optimale de sonde pour la détection de pB10	94
4.1.3. Détermination de la concentration d'ADN totale optimale pour la détection de pB10	95
4. 2. Optimisation des conditions de PCR pour la détection de DH5 α	96
4.2.1. Détermination des concentrations optimales d'amorces pour la détection de DH5 α	96
4.2.2. Détermination de la concentration optimale de sonde pour la détection de DH5 α	97
4.2.3. Détermination de la concentration d'ADN total optimale	98
5. Définition des seuils de détection	99
5. 1. Définition des seuils de détection sur ADN cible pur	99
5.1.1. Définition des seuils de détection	99
5.1.2. Variations intra et inter-essais	100
5.1.2.1. Variations intra-essais	100
5.1.2.2. Variations inter-essais	101
6. Sensibilité globale de la méthode	102
7. Quelle concentration de DH5 α /pB10 apporter initialement dans les microcosmes?	107

III. Stabilité et transfert du plasmide pB10 dans des matrices environnementales complexes 107

1. De la nécessaire vérification de la capacité à mesurer le devenir du nombre de copies d'un plasmide en matrice environnementale	108
2. Incidence de l'origine des boues biologiques issues de différentes stations d'épuration dites à boues activées, sur la stabilité et le transfert de pB10	116
3. Les conditions non aérées non brassées stabilisent DH5 α /pB10 dans les boues biologiques	120
4. L'ajout de sulfaméthoxazole et d'amoxicilline stabilisent DH5 α /pB10 dans les boues	122
5. Procédé kaldnes TM : le biofilm favorise le transfert du plasmide pB10	128
6. Les conditions de digesteur anaérobie favorisent le transfert de pB10	130
7. Et dans l'environnement? Effet de la matrice : Les sédiments de rivière, milieux propices au transfert ou au maintien de pB10	131
 IV. Discussion	 133
1. Détection du plasmide pB10 et de son hôte DH5 α à l'échelle moléculaire dans des matrices environnementales	133
2. De l'intérêt des microcosmes pour le maintien des matrices environnementales en laboratoire	136
3. Incidence des paramètres environnementaux sur la stabilité de pB10 ou de DH5 α /pB10	137
4. Incidence des paramètres environnementaux sur le transfert de pB10	139
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 145
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 151
 ANNEXES	 171

Introduction

Introduction

L'utilisation des antibiotiques en médecine fut initiée en 1938 à la suite de la synthèse des premières formes actives de sulfonamides par Domagk en 1932 (Davis, 2007). Depuis, les antibiotiques ont montré leur efficacité dans le traitement et la lutte contre les infections et la mortalité humaine (WHO, 2000). Ils sont aussi devenus fondamentaux dans la médecine vétérinaire, le traitement des cultures, et dans l'élevage comme facteurs de croissance où ils sont encore utilisés en tant que tel dans de nombreux pays. L'utilisation massive des antibiotiques depuis les années 50, a généré et continue de générer une libération importante de ces molécules dans l'environnement (McManus *et al.*, 2002 ; Singer *et al.*, 2003 ; Cabello *et al.*, 2006). Dans les années 60, une étude japonaise rapportait pour la première fois le cas d'une épidémie de dysenterie causée par des souches de *Shigella* qui avaient développé de multiples résistances aux antibiotiques. L'apparition de ces résistances semblait non seulement augmenter avec la production et la consommation d'antibiotiques mais il est apparu qu'elles étaient transférables à des souches initialement sensibles (Watanabe, 1963) (Figure 1). A cette époque, Watanabe avait évoqué pour la première fois l'implication de plasmides dans le transfert et l'acquisition des résistances antibiotiques mais ses travaux n'avaient alors pas vraiment trouvé crédit auprès de la communauté scientifique. Ce phénomène de transfert de résistance fut par la suite mis en évidence aux Etats -Unis en 1966 (Davis, 1995).

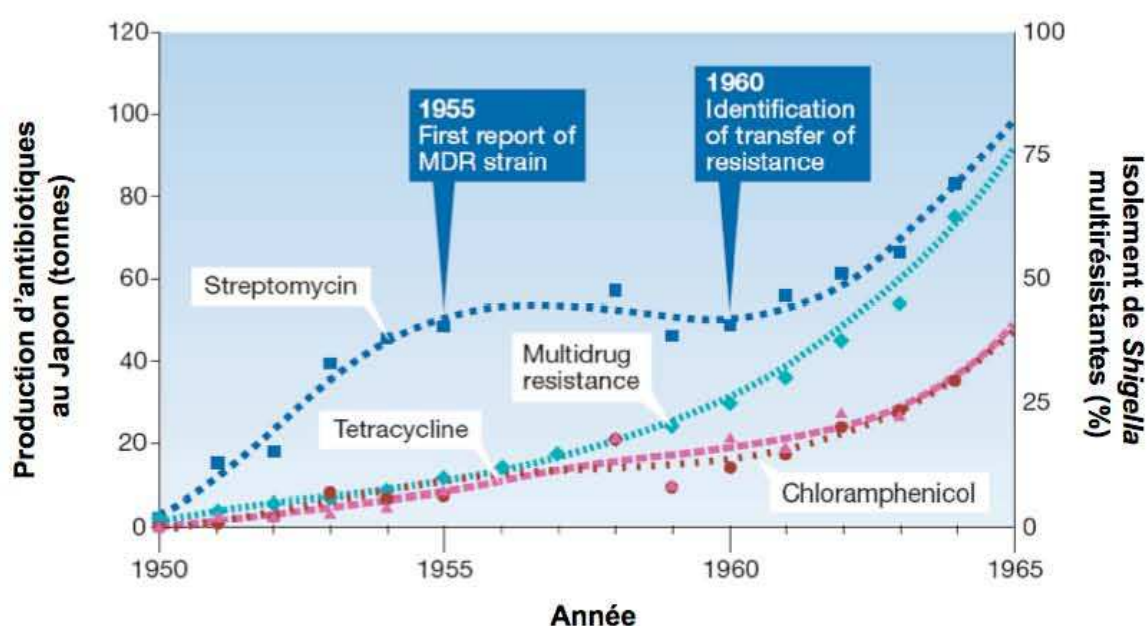


Figure 1 : Relation entre le développement de résistances aux antibiotiques chez des isolats cliniques de *Shigella* et l'introduction de l'antibiothérapie au Japon entre 1950 et 1965 (d'après Davies, 2007).

Depuis, l'émergence de bactéries résistantes directement liée à l'utilisation des antibiotiques a été mise en évidence dans de nombreuses études (Levey, 1998 ; Levy et Marshall, 2004 ; Salmond et Welch, 2008 ; Martinez 2009 et 2009b). La relation entre l'acquisition de résistance aux antibiotiques et le transfert d'entités génétiques mobiles telles que les plasmides est aujourd'hui bien connue. À cet égard, l'analyse de séquence de plasmides avant et après le début de l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique a mis en évidence la relation entre l'apparition des gènes de résistance aux antibiotiques présents sur ces éléments d'ADN mobiles et l'utilisation de ces molécules (Datta et Hughes, 1983 ; Hughes et Datta 1983).

Malgré ces travaux, l'émergence de résistances bactériennes liées à cette consommation d'antibiotique n'a été reconnue que tardivement par la conscience collective, en dépit de l'apparition fréquente de pathogènes mutants antibiorésistants comme par exemple l'apparition de résistances à la streptomycine de plus en plus marquées chez *Mycobacterium tuberculosis* (Davies, 2007). L'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques contribue significativement à diminuer notre potentiel d'action dans la lutte contre les pathogènes (Baquero *et al.*, 2008 ; Quinn 1998 ; Hancock et Speert, 2000 ; Ferrera *et al.*, 2006 ; Breidstein *et al.*, 2008 ; Martinez *et al.*, 2009b).

Indépendamment de leur fonction initiale dans un contexte naturel, l'afflux de gènes de résistance aux antibiotiques peut engendrer des modifications des écosystèmes naturels en favorisant certaines populations bactériennes (Martinez, 2009).

L'un des milieux les plus propices aux transferts de gènes de résistance est l'intestin car on y trouve une forte densité bactérienne contenant des bactéries résistantes, maintenue sous une pression antibiotique éventuelle (Hoffman *et al.*, 1998 ; Salyers *et al.*, 2004 ; Capozzi et Spano, 2009). Blake *et al.* (2003) ont d'ailleurs montré que l'intestin était un réservoir aux antibiorésistances et favorisait le transfert de gènes de résistance. Antibiotiques et bactéries résistantes sont ensuite excrétés dans les eaux usées via les fèces où ils peuvent atteindre les stations d'épurations (STEP) avant d'être finalement rejetés dans l'environnement. Parce que les STEP peuvent supporter une croissance de forte densité cellulaire, et qu'elles combinent microorganismes résistants et antibiotiques, certains auteurs suggèrent qu'elles pourraient aussi être un endroit propice au transfert de gènes de résistance et à l'émergence de bactéries résistantes (Nüsslein *et al.*, 1992 ; Marcinek *et al.*, 1998 ; Geisenberger *et al.*, 1999). De part sa place stratégique à l'interface entre les activités humaines et l'environnement, la STEP est le dernier rempart avant le rejet de bactéries antibiorésistantes dans l'environnement. De ce

fait, maîtriser les facteurs affectant le transfert de résistances en STEP, serait déjà un moyen de limiter la dissémination de résistance dans l'environnement.

L'objectif de notre travail était de déterminer l'influence de facteurs environnementaux sur la stabilité et le transfert d'un élément génétique mobile modèle, le plasmide pB10, dans des communautés bactériennes de biomasses issues de STEP (boues biologiques) maintenues en microcosmes. Parmi les retombées attendues de ce projet de recherche figurent l'acquisition de nouvelles connaissances qui permettraient une « autre » gestion de STEP si les stations devaient s'avérer une zone de transfert efficace. La stratégie expérimentale de notre étude est résumée sur la Figure 2.

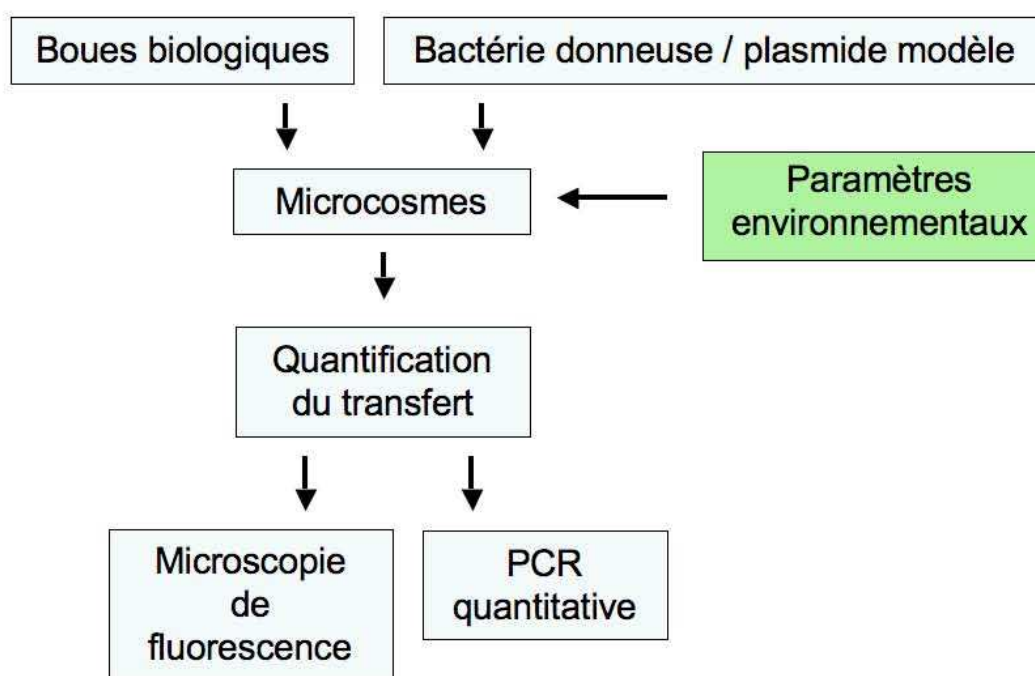


Figure 2 : Stratégie expérimentale développée pour l'étude

Des boues biologiques prélevées en STEP ont été inoculées avec une bactérie contenant un élément mobile porteur de gènes de résistance aux antibiotiques et maintenues dans des conditions contrôlées au laboratoire sur plusieurs jours. La stabilité et le transfert de l'élément mobile ont été estimés dans différentes conditions environnementales (concentration en oxygène, agitation du microcosme, ajout d'antibiotiques). À cette fin, deux techniques permettant de suivre spécifiquement le transfert de l'élément mobile modèle (plasmide pB10) ont été envisagées. La première technique, déjà connue, repose sur l'utilisation d'un plasmide modifié génétiquement pour exprimer une protéine fluorescente après transfert. Des

observations en microscopie à épifluorescence permettent alors de quantifier le transfert. La seconde approche, développée dans nos travaux, repose sur la quantification relative du plasmide et de son hôte initial par PCR quantitative (q-PCR) au cours du temps.

Aussi après une revue bibliographique portant sur les mécanismes de transferts de gènes, les techniques actuellement connues pour étudier ces transferts et les paramètres influençant ces transferts, dont les antibiotiques, le mémoire de thèse a été organisé en 4 parties :

- Le « Matériels et Méthodes » où sont détaillés tous les protocoles, les montages de microcosmes utilisés pour l'étude ainsi que les sites de prélèvements et les différentes souches bactériennes utilisées.
- Le développement d'une approche pour suivre des transferts de plasmide par microscopie à épifluorescence grâce à un marquage du plasmide retenu avec un gène rapporteur de *gfp*.
- Le développement et l'optimisation d'une technique de détection spécifique du plasmide et de son hôte bactérien donneur par q-PCR (technique qui a été l'objet de publications présentées en annexes), ainsi que les résultats obtenus dans les expérimentations en microcosmes et leurs analyses.
- La conclusion de nos travaux et les perspectives qui peuvent en découler.

Partie I : Étude bibliographique

I. Les transferts de gènes horizontaux : principaux mécanismes

Les premiers phénomènes de transferts de gènes horizontaux ont été découverts par Griffith (1928) qui démontra expérimentalement qu'en co-injectant à des souris deux souches de pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*), des pneumocoques non virulents avaient acquis la virulence de l'autre souche de pneumocoques (initialement virulents). Le phénomène de transformation fut ensuite clairement identifié par Oswald (1944) comme responsable de ce transfert de gènes. Suivirent ensuite l'identification des transferts médiés par les virus (transduction), d'éléments transposables (transposition) et les plasmides (conjugaison). Dans leurs travaux, Watanabe *et al.* (1964) identifient clairement et pour la première fois les mécanismes de transduction et de conjugaison comme étant impliqués dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. De nombreuses études montreront ensuite l'importance de ces mécanismes dans les flux de gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Les éléments mobiles (plasmides, transposons, intégrons et phages) sont largement reconnus comme jouant un rôle prépondérant dans le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques au sein de communautés microbiennes (Salyers et Amabile-Cuevas, 1997 ; Osborn et Böltner, 2002 ; Top et Springael, 2003 ; Wang *et al.*, 2005). Ces différents types d'entités sont susceptibles de diriger les transferts génétiques selon différents modes qui sont résumés comme sur la figure 3: les bactériophages avec la transduction, les transposons et les intégrons avec le déplacement et la capture de gènes, les plasmides transférables avec la conjugaison, ou encore la transformation par internalisation d'ADN libre extracellulaire. À l'heure actuelle, les plasmides conjugatifs sont considérés comme jouant le rôle le plus significatif dans le transfert de gènes de résistance (Thomas, 2000 ; Thomas et Nielsen, 2005 ; Sota et Top, 2008 ; Kelly *et al.*, 2009).

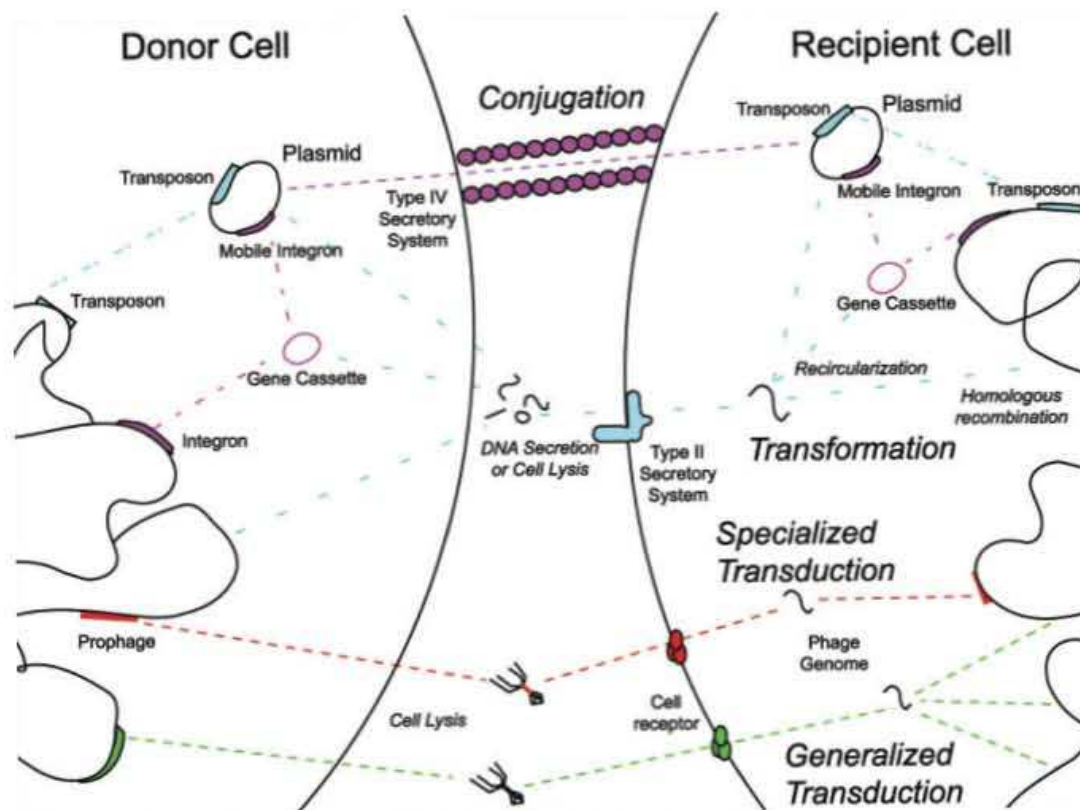


Figure 3 : Mécanismes inter et intracellulaires impliqués dans les transferts horizontaux de gènes (d'après Zaneveld *et al.*, 2008). Un type d'élément mobile peut être mobilisé par plusieurs mécanismes de transferts différents.

1. La transformation bactérienne

La transformation correspond à l'incorporation d'un ADN extracellulaire, linéaire ou circulaire, que la bactérie a acquis dans son environnement proche (Dubnau, 1999). Ces ADN extracellulaires ont été soit libérés par la lyse de cellules mortes ou de particules virales, soit excrétés par des cellules viables. Pour parvenir à intégrer ces fragments d'ADN il est nécessaire que la bactérie se trouve dans un état physiologique particulier appelé compétence qui implique environ 20 à 50 protéines. Cet état de compétence est limité dans le temps et il est induit en réponse à des conditions environnementales spécifiques (stress nutritif, altération des conditions de croissance, densité cellulaire, présence d'antibiotique, ...) variables selon l'espèce et la souche bactérienne considérée (Cohan *et al.*, 1991).

Les mécanismes d'acquisition d'ADN par transformation, connus à ce jour peuvent être résumés ainsi : les ADN extracellulaires se fixent à la surface de la cellule sur des récepteurs spécifiques dont le nombre peut varier de 30 à 80 par cellule (Dreiseikermann, 1994 ; Puyet *et al.*, 1990). L'ADN double brin fixé est transloqué au niveau de la membrane interne, clivé, puis converti en ADN simple brin pendant la translocation (Chen et Dubnau, 2004). Certaines espèces bactériennes comme *N. gonorrhoeae* sont sélectives dans les fragments d'ADN

transloqués mais la majorité des espèces intègre les fragments d'ADN sans sélection de séquence (Lorenz et Wackernagel, 1994). Si l'ADN transformé est maintenu sous une forme stable dans la cellule, il peut être intégré au chromosome bactérien, à un plasmide ou à de l'ADN phagique par recombinaison homologue. Dans le cas de l'intégration d'un plasmide par transformation, l'élément doit être recircularisé pour être maintenu (Lorenz et Wackernagel, 1994 ; Averhoff, 2004; Thomas et Nielsen 2005).

Si ce mécanisme est relativement important pour la réparation du génome de certaines bactéries en intégrant des séquences homologues, il contribue largement à l'évolution du génome par les mutations et l'acquisition de nouvelles séquences qu'il engendre (De Vries *et al.*, 2001 ; Majewski *et al.*, 2000 ; Townsend *et al.*, 2003). Notons que chez certaines bactéries, des fragments d'ADN peuvent être intégrés sans que l'on ait une homologie totale. L'intégration du fragment nécessite une seule extrémité homologue pour se fixer au niveau de zones facilitant l'intégration de ces ADN exogènes nommées « homology-facilitated illegitimate recombination » (Meier et Wackernagel, 2003).

2. La transduction

La transduction est un phénomène qui a été mis en évidence par Zinder et Lederberg (1952) chez *Salmonella typhimurium*. Elle consiste en l'acquisition de séquences d'ADN par la bactérie suite à une infection par un bactériophage. On distingue la transduction généralisée et la transduction spécialisée qui reposent sur des phénomènes différents (Zaneveld *et al.*, 2008). La transduction généralisée concerne n'importe quelle séquence du génome bactérien et survient lors de la formation du virus où un fragment d'ADN bactérien (chromosomique ou extra-chromosomique) est encapsidé par erreur et remplace l'ADN phagique dans la particule virale formée (la taille du fragment d'ADN bactérien incorporé est proche de celle de l'ADN phagique). Typiquement l'encapsidation de l'ADN viral est assurée par la reconnaissance de sites spécifiques sur la séquence ADN : les sites *pac*. Des séquences ADN contenues dans le chromosome de l'hôte peuvent parfois ressembler aux sites *pac* et générer des erreurs de reconnaissance conduisant à l'encapsidation d'un ADN bactérien. Le phage formé ne peut plus se répliquer dans ce cas, mais il peut infecter une autre cellule et transférer le fragment d'ADN bactérien encapsidé. Le fragment d'ADN peut éventuellement être incorporé dans le génome bactérien par recombinaison homologue (Griffiths *et al.*, 1997).

La transduction spécialisée intervient avec les phages capables de lysogéniser la cellule en s'intégrant au génome de l'hôte. Cette intégration se fait par une recombinaison spécifique

catalysée par une intégrase phagique, entre une séquence d'ADN phagique *attP* et une séquence d'ADN hôte *attB*. Lors de son développement lytique, le prophage s'excise du génome par une recombinaison spécifique de sites réciproques. Si le phage n'est pas correctement excisé du génome bactérien, la région adjacente au prophage sur l'ADN de l'hôte peut être excisée en même temps dans le génome viral et se retrouver encapsidée dans le virus (Jensen *et al.*, 1998 ; Canchaya *et al.*, 2003). Cette erreur d'excision survient lorsque la région adjacente possède un site *attP* secondaire. Ce type de transduction implique des sites spécifiques de recombinaison et se trouve donc limité à une toute petite portion du génome de l'hôte.

3. Transposons et intégrons

Les intégrons et les transposons sont des éléments mobiles portés par d'autres segments d'ADN et sont mobilisés grâce à ces segments (Merlin *et al.*, 2000).

Les intégrons ont été identifiés par Stokes et Hall (1989) et rapidement définis comme étant le support de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques (Zaneveld *et al.*, 2008). Ils ont été identifiés sur des chromosomes bactériens et des plasmides (Mazel, 2006). Ils consistent essentiellement en un système de 3 éléments : le gène *intI* codant pour une intégrase, un promoteur, et un site de recombinaison *attI* (Fluit et Schmitz, 2004). Les intégrons ne possèdent pas de gènes codant pour un système assurant leur propre mobilité. Ils facilitent le transfert et l'expression de cassettes de gènes, en intégrant ces cassettes au niveau de leur site de recombinaison. L'intégration résulte d'une recombinaison spécifique entre le site *attI* de l'intégron et le site *attC* de la cassette alors sous forme circulaire. Le nombre de cassettes de gènes intégrées sur la structure d'un intégron peut varier de 0 à 100 (Rowe-Magnus *et al.*, 2001). Comme ils sont parfois portés par des plasmides capables de se transférer efficacement et comme les gènes intégrés sont sous la dépendance d'un promoteur qui permet leur expression, les intégrons peuvent avoir un rôle important dans les transferts des gènes de résistance aux antibiotiques et l'émergence de bactéries antibiorésistantes (Zaneveld *et al.*, 2008).

Les transposons sont des éléments qui sont capables se déplacer par eux même (transposition) voir de se répliquer au sein du génome de la bactérie qui les héberge. Cependant, pour être transférés d'une cellule à une autre, ces éléments doivent être associés à des éléments génétiques capable de mobilité intercellulaire tel que certains plasmides, les phages, ou encore les ICE (Integrative and Conjugative Elements, ou transposons conjugatifs).

Les éléments transposables se composent à minima d'un gène codant pour une transposase (enzyme assurant la transposition de l'élément mobile) et de séquences inversées répétées bordant l'élément. La transposase reconnaît les régions inversées répétées et catalyse la transposition des extrémités du transposon vers un site cible. Outre les séquences impliquées dans la transposition, les transposons peuvent porter des gènes accessoires comme des gènes de résistance aux antibiotiques par exemple (Galimand *et al.*, 2005).

Selon le type de transposons, deux types de transposition sont distingués: la transposition conservative et la transposition répllicative. Dans le premier cas, la transposition consiste en un déplacement pur et simple de l'élément au sein du génome. Dans le deuxième cas, une copie du transposon est générée durant le processus de transposition conduisant à une augmentation brute du nombre de copies de l'élément dans le génome (Curcio et Derbyshire, 2003 ; Merlin *et al.*, 1999 ; Siguier *et al.*, 2006).

4. La conjugaison

Parmi tous les mécanismes intervenant dans les transferts horizontaux de gènes entre bactéries, la conjugaison est considérée comme étant le plus important et le plus efficace (Thomas, 2000; Thomas et Nielsen, 2005 ; Sota et Top, 2008). La conjugaison implique le transfert d'ADN entre deux cellules par l'intermédiaire d'un contact cellulaire initié par des pili conjuguatifs. Différents éléments peuvent être transférés par la conjugaison : des plasmides, des éléments de type ICEs (integrative and conjugative elements) mais aussi des régions de chromosomes bactériens (Tatum et Lederberg, 1947; Franke et Clewell, 1981; Burrus *et al.*, 2002).

Dans le cas des plasmides, le transfert conjuguatif peut être résumé comme tel : un pili établi par la bactérie donneuse rentre en contact avec la bactérie receveuse (Figure 4 (2)), les deux brins complémentaires d'ADN plasmidique sont séparés par une relaxase qui se fixe en *cis* sur l'origine de transfert (*oriT*). La fixation de la relaxase induit la formation du complexe appelé relaxosome et l'on a clivage de l'un des deux brins ADN au niveau d'un motif conservé *nic* situé au niveau de l'*oriT*. La réplication du brin matrice circulaire dans la bactérie donneuse est initiée (Figure 4 (2)). Dans le même temps, la relaxase fixée à l'extrémité du brin d'ADN plasmidique complémentaire, va interagir avec un complexe protéique (appelé transférosome) pour transférer l'un des brins d'ADN vers la cellule receveuse. La synthèse du brin complémentaire au brin restant dans la donneuse contribue à expulser le brin complémentaire dans la cellule receveuse (Figure 4 (3)). Dans la cellule receveuse l'ADN simple brin est converti en ADN double brin par synthèse d'un brin complémentaire. A la fin de la synthèse des brins complémentaires dans les deux cellules, les deux plasmides sont liés entre eux par la

région *oriT*. C'est à ce niveau qu'intervient la séparation des deux plasmides. Le pont cytoplasmique se résorbe et les deux cellules sont libérées, possédant chacune une copie du plasmide et devenant toutes deux des donneuses potentielles (Figure 4 (4)).

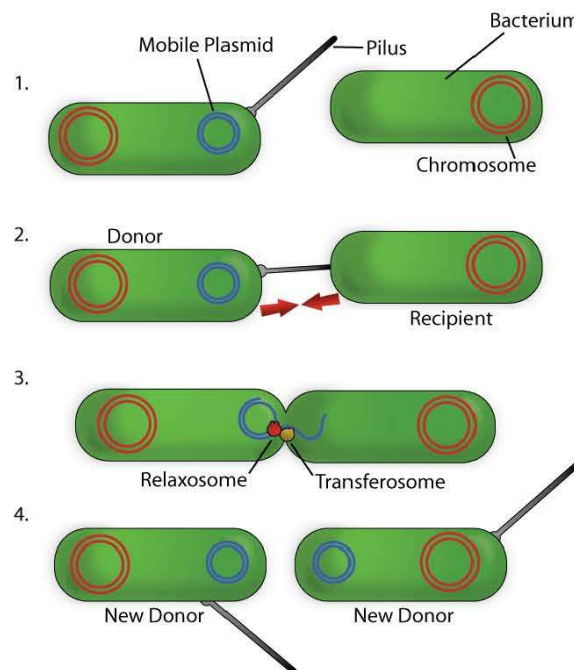


Figure 4 : Mécanisme de conjugaison bactérienne (Griffith *et al.*, 1999).

Certains plasmides ont un large spectre d'hôte et de ce fait ils peuvent être présents dans une grande diversité d'espèces comme c'est le cas par exemple pour les plasmides de la famille IncP (Davison, 1999 ; Ochman *et al.*, 2000).

II. Les outils d'étude des gènes de résistance aux antibiotiques et du transfert de gènes dans l'environnement

Jusqu'à tout récemment, le transfert d'éléments mobiles en conditions environnementales a principalement fait appel à des approches basées sur la culture (Gealt *et al.*, 1985 ; Gowland *et al.*, 1984). Typiquement, ces approches ont consisté à inoculer des échantillons environnementaux avec une bactérie contenant un élément génétique mobile porteur de marqueurs sélectionnables (ex. gènes de résistance aux antibiotiques). Les bactéries indigènes ont ensuite été extraites à différents temps et mises en culture sur des milieux de culture synthétiques sélectifs (*i.e.* contenant des antibiotiques appropriés pour sélectionner et distinguer les souches parentales des transconjugants). L'énumération des populations de bactéries donneuses, receveuses, et transconjugantes a ainsi permis d'estimer s'il y avait eu transfert des résistances et à quelle fréquence.

Cependant, les techniques basées sur la culture des bactéries présentent plusieurs limites. En premier lieu, on estime que moins de 1% de la flore bactérienne environnementale est capable de se développer sur des milieux de culture synthétiques (Torsvik *et al.*, 1990 ; Amann *et al.*, 1995). Dans ce cas, la fraction de bactéries cultivées est loin d'être représentative de la population bactérienne réelle en terme de diversité. Deuxièmement, l'identification des bactéries portant les gènes transférés est basée sur la sélection d'un phénotype. Ainsi, il est nécessaire que les gènes sélectionnés soient exprimés pour que les bactéries se développent sur le milieu de croissance sélectif. Certaines espèces ayant acquis un plasmide d'intérêt ne vont pas nécessairement exprimer les phénotypes qui lui sont associés, et les transferts seront donc sous-estimés. En revanche, ces microorganismes n'en demeurent pas moins des donneurs potentiels susceptibles de continuer à jouer un rôle dans le transfert de l'élément considéré vers la communauté. Enfin, différents stress environnementaux peuvent induire un état physiologique dit « viable non cultivable » (VNC) conduisant à des bactéries qui seront transitoirement incapables de se développer sur milieu nutritif de synthèse pourtant adéquat, et de ce fait les transferts sont à nouveau sous-estimés lors du dénombrement des différentes populations de bactéries (donneuses et transconjugants) que l'on souhaite sélectionner (Garcia-Armisen et Servais, 2004).

Pour palier à ces biais, de nouvelles techniques d'étude *in situ* ont été développées en évitant autant que faire se peut les étapes de cultures, et mettant en jeu des constructions génétiques contenant des gènes rapporteurs. À ce jour, les seuls systèmes qui ont permis de suivre des transferts plasmidiques dans l'environnement ont principalement été basés sur l'utilisation de la GFP (green fluorescent protein) (Dahlberg *et al.*, 1998 ; Sørensen *et al.*, 2005). Ces systèmes reposent sur l'utilisation d'un plasmide modifié par l'insertion d'une cassette contenant le gène de la GFP placé sous le contrôle du promoteur P_{lac} . En utilisant une bactérie donneuse génétiquement modifiée pour exprimer le répresseur LacI, le promoteur P_{lac} reste inactif et la cellule ne produit pas de GFP. Par contre, lorsque qu'une copie du plasmide est transférée vers une bactérie receveuse indigène, l'absence de répresseur permet l'expression du gène *gfp* et ainsi la bactérie ayant acquis le plasmide émet une fluorescence détectable (Figure 5).

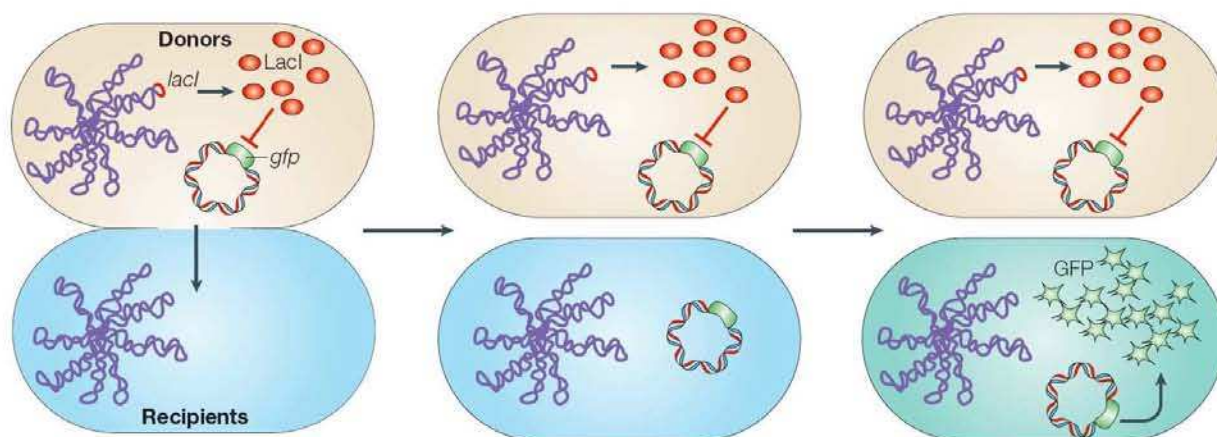


Figure 5 : Principe du transfert de plasmide suivi par épifluorescence selon Geisenberger *et al.*, 1999 (Illustration d'après Sørensen *et al.*, 2005).

Plus récemment, le système a été amélioré par un double marquage, dans lequel le chromosome bactérien de la bactérie donneuse est également modifié avec l'insertion d'un gène codant une protéine RFP ou dsRED (Red Fluorescent Protein) (Mølbak *et al.*, 2003 ; Nancharaiyah *et al.*, 2003). Dans ce cas, la localisation ainsi que le comptage des cellules donneuses (rouges fluorescentes) et des transconjugants (vertes fluorescentes) est possible par microscopie à épifluorescence sans avoir recours à la culture. Par rapport aux techniques basées sur la culture, les approches utilisant la fluorescence présentent aussi l'avantage de tenir compte de la variabilité des efficacités de transfert selon la zone de la matrice environnementale étudiée.

Cependant, ces techniques nécessitent l'insertion d'un nouvel élément dans la séquence du plasmide étudié ou du chromosome bactérien de la bactérie donneuse. Ces insertions peuvent avoir des conséquences sur les propriétés du plasmide et de son hôte, pouvant aller jusqu'à affecter la fréquence de transfert, l'expression de résistances à des toxiques codées par l'élément ou encore la physiologie globale de la bactérie. Dans certains cas, le plasmide dont les transferts sont étudiés peut être instable et l'on a par conséquent une perte de l'outil développé. De plus, il peut exister une variation de l'expression de la GFP selon l'espèce bactérienne et les conditions environnementales (Errampalli *et al.*, 1999). Ajoutons à cela qu'il peut y avoir des interférences avec des particules fluorescentes dans la matrice environnementale considérée pouvant biaiser les observations. Enfin, certaines GFP ne peuvent pas être utilisées en conditions anaérobies strictes car ces conditions ne permettent pas l'oxydation nécessaire à la maturation de la protéine pour qu'elle devienne fluorescente (Errampalli *et al.*, 1999). La technique reste malgré cela un bon moyen d'estimation des

transferts *in situ*, mais il convient de tester préalablement l'incidence de l'insertion du gène rapporteur sur la physiologie cellulaire et les propriétés du plasmide.

L'avènement des techniques moléculaires a également permis de s'affranchir des techniques basées sur la culture bactérienne. Différentes techniques basées sur la PCR ont été développées dans le but d'estimer les concentrations dans l'environnement des gènes de résistance aux antibiotiques ou d'éléments génétiques mobiles auxquels sont associés des gènes de résistance. Les éléments mobiles les plus étudiés par cette technique restent les intégrons.

La technique de PCR quantitative (q-PCR)(Zhang *et al.*, 2006), a déjà été largement éprouvée dans la détection et le dosage de gènes de résistance aux antibiotiques dans différents environnements : eaux de surface (Mackie *et al.*, 2006), sédiments de rivière (Pei *et al.*, 2006), station d'épuration (Auerbach *et al.*, 2007) par exemple. La PCR multiplex est basée sur le même système que la q-PCR mais combine dans la même réaction plusieurs systèmes de détection et permet de détecter différents gènes en même temps (Bell *et al.*, 1998 ; Jensen *et al.*, 2002 ; Gilbride *et al.*, 2006 ; Agersø *et al.*, 2007). Malgré quelques biais liés à la PCR (Markoulatos *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2009), cette technique reste un bon compromis entre rapidité et détection de gènes de résistance aux antibiotiques dans des ADN environnementaux. De nombreux exemples de dosage de gènes de résistance aux antibiotiques dans des environnements aquatiques sont résumés dans les travaux de Zhang *et al.* (2009). Les mêmes approches ont été développées en détectant et dosant différentes classes d'intégrons auxquels sont associés des gènes de résistance aux antibiotiques (Byrne-Bailey *et al.*, 2009 ; Laroche *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2009 ; Moraga *et al.*, 2007 ; Ozgumus *et al.*, 2009). Ces approches permettent d'établir en quelque sorte un état des lieux en estimant la présence, la quantité et l'étendue des environnements dans lesquels sont présents ces éléments génétiques. En revanche elles ne permettent pas de mettre en évidence directement et spécifiquement le transfert de gène. On extrapole donc en assimilant une augmentation de la fréquence d'une séquence ADN redondante à du transfert.

Les techniques développées n'ont pas encore permis d'étudier le transfert et le devenir d'un élément mobile donné dans un environnement et d'étudier les facteurs qui influent sur son transfert. Et c'est précisément ce que nous nous proposons d'effectuer dans cette étude en développant un système de détection basé sur la q-PCR et spécifique d'un plasmide afin d'étudier sa dispersion dans des communautés bactériennes complexes.

III. Les principaux paramètres environnementaux qui influencent les transferts de gènes

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'influence de facteurs environnementaux sur le transfert des éléments génétiques mobiles. Ces phénomènes sont particulièrement documentés dans le cas des facteurs affectant le transfert des plasmides conjugatifs (conjugaison) qui jouent un rôle majeur dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques (Weigel *et al.*, 2003; Levy et Marshall, 2004 ; McGowan, 2006 ; Welch *et al.*, 2007). Comme les environnements naturels sont souvent hétérogènes et dynamiques, les conditions peuvent varier dans le temps et l'espace. Ainsi, selon le modèle plasmidique étudié et l'environnement considéré, certains paramètres identifiés comme déterminants dans un cas ne le sont pas nécessairement dans un autre. Quoiqu'il en soit, ces paramètres peuvent se classer en paramètres biotiques ou abiotiques.

Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux facteurs abiotiques dans les environnements aquatiques, l'un des premiers facteurs mis en évidence est la température. Fry *et al.* (1990) ont montré que le taux de transfert de plasmide pBRC60 était corrélé à la température de l'eau dans des expérimentations en microcosmes et *in situ*. Bale *et al.* (1987) ont montré qu'une élévation de température de 14°C (passant de 6°C à 20°C) multipliait les fréquences de transfert du plasmide pQM1 (*P. aeruginosa* PAO2002 et *P. aeruginosa* PU2) d'un facteur 10^3 à 10^8 en microcosmes et *in situ*. D'autres études ont caractérisé cet effet, notamment celle de Fernandez-Astorga *et al.* (1992), dans des essais de transferts entre deux *E. coli* avec la même incidence de la température mais uniquement lorsque des nutriments étaient ajoutés aux microcosmes d'eau.

La disponibilité de substrats carbonés dans le milieu est également un facteur important. En présence de nutriments dans de faibles concentrations, le transfert plasmidique se trouve limité sur milieux de culture synthétiques ou en microcosmes sans toute fois les interdire complètement (Fernandez-Aguerosa *et al.* 1992 ; Muela *et al.*, 1994 ; Van veen *et al.*, 1994 ; Fox *et al.*, 2008).

L'organisation du milieu est importante. Fox *et al.* (2008) et Zhong *et al.* (2009) ont mis en évidence que sous forme planctonique deux souches de *E. coli* n'étaient pas capables de transférer le plasmide pB10 lorsque le milieu de culture n'était pas agité ou agité à plus de 50 rpm. À l'inverse, de nombreuses études rapportent les systèmes statiques comme un avantage certain pour la conjugaison, par exemple lorsque les bactéries sont fixées à des agrégats ou organisées en biofilm. Des essais en microcosmes d'eau de rivière ont montré que l'adhésion

des bactéries à des supports facilitaient les transferts plasmidiques (Day *et al.*, 1992 ; Hill *et al.*, 1994 ; Perkins, 1994). Ces observations ont été également constatées dans des essais en « flow cells » où il a été montré que le plasmide RP4 se transférait plus facilement en biofilm sans toute fois envahir toutes les couches du biofilm (Christensen *et al.*, 1998). On ne connaît pas les raisons de cette colonisation partielle (Licht *et al.*, 1999 ; Molin et Tolker-Nielsen, 2003). Mais Fox *et al.* (2008) ont montré l'importance de la réorganisation spatiale du milieu. Dans leurs essais, deux *E. coli* ont été cultivées en biofilm. Une organisation perturbée une fois par jour et a eu un effet bénéfique sur le transfert du plasmide pB10 qui a envahi alors la totalité de la population de bactéries receveuses.

Si l'on s'intéresse aux facteurs biotiques, on peut en premier lieu citer la nature de bactérie donneuse. Selon l'espèce bactérienne considérée, le plasmide ne sera transféré qu'à certaines autres espèces bactériennes seulement. La nature et le nombre possible d'espèces bactériennes pouvant potentiellement être receveuses est variable selon l'espèce bactérienne donneuse considérée. Par exemple, dans leurs travaux, De Gelder *et al.* (2005) ont montré que selon la nature de la bactérie donneuse (*Pseudomonas putida* SM1443, *Ralstonia eutropha* JMP228, and *Sinorhizobium meliloti* RM1021), le nombre et la diversité d'espèces bactériennes issues de communautés microbiennes de boues biologiques auxquelles était transféré le plasmide était variable. D'autres études ont d'ailleurs mis en évidence ce même paramètre pour d'autres plasmides (Sandaa et Enger, 1994 ; Pukall *et al.*, 1996 ; Geisenberger *et al.*, 1999).

L'état physiologique de la bactérie donneuse est un facteur influant sur le transfert conjugatif. Peng *et al.* (1994) ont montré l'incidence de l'état physiologique sur le transfert de différents plasmides IncP (RP4, R68.45, RP1::Tn501, et pUB307) entre *E. coli* et *T. ferrooxidans*. Dans certains cas, on observe une baisse de fréquence en phase exponentielle et une augmentation en phase stationnaire. L'état physiologique de la receveuse en revanche ne change rien (Thomas *et al.*, 2000). Il a même été observé que le transfert avait eu lieu lorsque les bactéries n'avaient plus de source d'énergie disponible. Résultats constatés également par Lebaron *et al.* (1993) dans des essais de transfert entre deux *E. coli* K12 dans des eaux usées.

Certaines communautés bactériennes peuvent favoriser le transfert (Frost *et al.*, 2009). Dans ce cas, on ne peut pas exclure d'autres paramètres incidents sur les communautés bactériennes, comme la prédation par les protozoaires. Les études réalisées ont permis de constater que la prédation entraînait une diminution des populations bactériennes et activait la division d'une partie des bactéries présentes dans le milieu et donc influait sur leur état physiologique pour part (van Elsas, 1993 ; Hill et Top 1998).

La qualité chimique de l'environnement influence aussi le transfert. Ainsi, on sait que l'effet des antibiotiques ne se limite pas à la sélection de microorganismes antibiorésistants lorsqu'ils sont en concentration suffisamment élevée. De plus en plus d'études montrent que les antibiotiques continuent d'exercer des effets en concentration sub-inhibitrice en induisant la virulence chez *Escherichia coli* O157:H7 (Herold *et al.*, 2005) par exemple et finalement en stimulant le transfert de gènes.

IV. Les antibiotiques

1. Définition et propriétés

Les antibiotiques sont couramment définis comme des substances biologiques (synthétisées par des champignons ou des bactéries) ou synthétiques capables de tuer ou d'inhiber la croissance bactérienne. Néanmoins cette définition est relativement réductrice dans la mesure où elle ne tient compte que de l'effet pour lequel ces molécules sont utilisées en médecine et à des concentrations très supérieures à celles rencontrées dans l'environnement. En effet, selon Davies (2006), certains antibiotiques naturels exercent un effet régulateur sur la physiologie de la cellule lorsqu'ils sont présents à des concentrations largement inférieures à celles utilisées dans le domaine thérapeutique. À cet égard deux études ont mis en évidence que des quinolones et une série de composés de type 4-hydroxy-2-alkylquinolone, reconnus comme molécules antibiotiques, avaient également un rôle de messagers intercellulaires chez de nombreuses *Pseudomonas* (dans le domaine de la régulation globale de la virulence notamment) (Pesci *et al.*, 1999 ; Deziel *et al.*, 2004).

Les antibiotiques sont classés en plusieurs familles et ceci selon différents critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (Verhoef *et al.*, 2004). Ces principales grandes familles sont les suivantes :

- **β lactamines** : Le noyau de base est le cycle β lactame. Les antibiotiques de cette famille sont des bactéricides. On y trouve les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactams.
- **Les aminosides ou aminoglycosides** qui sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Ce sont des bactéricides et il en existe plusieurs centaines, naturels ou semi synthétiques.
- **Les phénicolés** de type chloramphénicol et thiamphénicol qui sont des bactériostatiques.
- **Les tétracyclines** sont des bactériostatiques naturels ou semi synthétiques.

- **Les polypeptides** sont des bactéricides décomposés en sept groupes (peptides linéaires, peptides cycliques, glycopeptides, glycolipeptides, lipopeptides, polypeptides thiazoliques et autres). Ces divers groupes se subdivisent en sous groupes en fonction de leur structure chimique, de l'activité antibactérienne, du mécanisme d'action et de la nature de leur cible cellulaire.
- **Les macrolides, lincosamides et synergistines** : les macrolides possèdent un noyau lactone central qui est à la base de leur classification selon le nombre d'atomes de carbone. Ce sont des molécules lipophiles. Les lincosamides et les synergistines sont associés aux macrolides car elles ont le même mode d'action consistant en l'inhibition de la synthèse protéique au niveau de la sous unité 50s du ribosome. Ce sont des bactériostatiques.
- **Les sulfamides** qui sont constitués d'un noyau paraminobenzène sulfonamide sur lequel se greffe un radical variable qui détermine leur pharmacocinétique, leur durée d'action et/ou leur site d'action. Le plus utilisé est le sulfaméthoxazole.
- **Les quinolones ou fluoroquinolones** ont une structure générale dérivant de l'acide dihydroxy-1,4-oxo-4-quinoléine carboxylique et sont bactéricides. Elles se classent en quinolones de première et deuxième génération selon l'étendue de leur spectre antibactérien et la nature fluorée ou non de leur squelette.

Du point de vue physico-chimique, certains antibiotiques possèdent une forte polarité, sont faiblement volatiles et leur solubilité dans l'eau est variable. Les macrolides (comme la clarithromycine, l'érythromycine et la roxithromycine) et les aminosides sont les antibiotiques les plus solubles dans l'eau.

La capacité de sorption aux matières organiques et minérales des antibiotiques est gouvernée par plusieurs mécanismes propres à la structure des antibiotiques et de leur cible. Dans certains cas, l'hydrophobicité permet d'expliquer les fortes capacités de sorption à la matière organique (Huang *et al.*, 2001). Dans d'autres cas, par exemple pour les tétracyclines et les quinolones, leur capacité de complexation par des cations divalents, des échanges d'ions, des liaisons hydrogènes entre des groupements acides des acides humiques et des groupements polaires de certaines molécules antibiotiques seraient à l'origine de leur forte adsorption aux matières organiques (Thiele-Bruhn, 2003). Ces propriétés d'interactions des antibiotiques avec la matière organique accentueraient leur capacité de persistance dans l'environnement. Complexés à la matière organique, ils seraient moins facilement disponibles pour la dégradation biotique et abiotique et moins mobiles (Tolls, 2001). Associée à leur faible

volatilité, cette propriété des antibiotiques augmente leur capacité d'accumulation dans les écosystèmes (Daughton et Ternes, 1999). Ainsi, on peut résumer de façon générale le comportement de certaines molécules par le schéma de la figure 6.



Figure 6 : Capacités d'adsorption et mobilité dans l'environnement des antibiotiques

En bref, les propriétés physico-chimiques de l'antibiotique considéré et celles de son environnement déterminent la répartition de la molécule entre la phase aqueuse et les matières solides (Golet *et al.*, 2003 ; Göbel *et al.*, 2004 ; Joss *et al.*, 2005 ; Lindberg *et al.*, 2006). Cependant, la prédiction du comportement de ces antibiotiques n'est pas simple en raison de la méconnaissance des matériaux auxquels ils peuvent s'associer. Ce constat est par exemple fait pour les macrolides dont le coefficient de sorption est élevé dans certaines conditions *in vitro* (MacFarland *et al.*, 1997), ce qui n'est pas observé dans l'étude de Göbel *et al.* (2005 b) où les macrolides étudiés (érythromycine, roxithromycine et clarithromycine) sont principalement présents dans la phase aqueuse.

2. Effets des antibiotiques sur les bactéries : l'hormésie

Les antibiotiques sont généralement reconnus pour leurs propriétés bactériostatiques ou bactéricides. De fait, ces effets sont observés pour des concentrations au moins égales à la concentration minimale inhibitrice (CMI). D'un point de vue général, le mode d'action des antibiotiques en thérapeutique peuvent être résumés en 5 mécanismes différents et fonction de la famille d'antibiotiques considérée (Tableau I) :

- Inhibition de la synthèse du peptidoglycane entraînant une altération de la paroi bactérienne
- Action sur la membrane cytoplasmique
- Perturbation de la synthèse protéique au niveau d'une des deux sous unités du ribosome

- Inhibition de la synthèse d'ADN
- Les analogues de vitamines

**Tableau I : Mécanismes d'action généraux des familles d'antibiotiques
(Verhoef *et al.*, 2004)**

Cibles cellulaires	Familles d'antibiotiques	Mécanismes d'action	Type d'activité
Paroi bactérienne	β -lactamines	Inhibition de la dernière étape de synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne	Bactéricide
Paroi bactérienne/ Membrane cellulaire	Polypeptides	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi ; déstabilisation de la membrane bactérienne	Bactéricide
Sous unités des ribosomes	Aminosides	Inhibition de la synthèse protéique par fixation à la sous unité ribosomique 30s	Bactéricide
	Tétracyclines		Bactériostatique
	Macrolides, Lincosamides, Synergistines	Inhibition de la synthèse protéique par fixation à la sous unité ribosomique 50s	Bactériostatique
	Phénicolés		
Synthèse de l'ADN	Quinolones	Inhibition de la synthèse d'ADN de la bactérie par fixation au complexe ADN/gyrase	Bactéricide
	Sulfamides	Inhibition de la synthèse d'ADN par inhibition de la synthèse de l'acide folique	Bactériostatique

Dans l'environnement, les antibiotiques sont présents en des quantités bien inférieures à celles utilisées en médecine si bien que leurs effets éventuels ont suscité peu d'intérêt jusqu'à tout récemment. Ce n'est que ces 10 dernières années que la communauté scientifique s'est penchée sur les effets des antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices. Il est apparu que de nombreuses molécules antibiotiques présentaient un effet hormétique, à savoir un effet inhibiteur à concentration thérapeutique et un effet stimulateur pour des concentrations plus basses et inférieures à la CMI. Ces effets stimulateurs sont variables d'une molécule à l'autre (Yim *et al.*, 2006). Goh *et al.* (2002) ont montré que chez *Salmonella typhimurium* la rifampicine à une concentration de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et l'érythromycine à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pouvaient moduler jusqu'à 5% des promoteurs de la bactérie conduisant ainsi à des changements physiologiques (Figure 7). D'autres études ont mis en évidence cet effet modulateur de certains macrolides, lincosamides et synergistines à doses sub-inhibitrices sur la réponse transcriptionnelle (Tsui *et al.*, 2004 ; Linares *et al.*, 2006 ; Fajardo et Martinez, 2008).

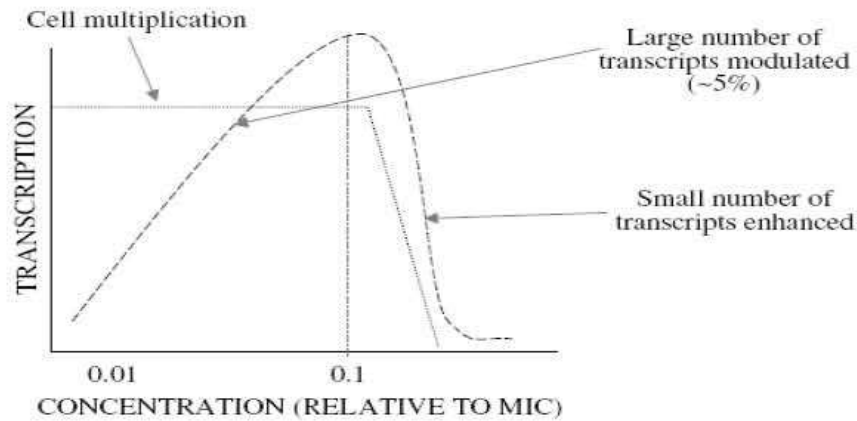


Figure 7 : Représentation de l'effet hormétique des antibiotiques : modulation de la transcription à concentration sub-inhibitrice et effet bactériostatique ou bactéricide à concentration élevée (Davies, 2006).

Depuis ces études, d'autres travaux sont venus appuyer la notion d'effet hormétique associé aux antibiotiques. Les effets à concentrations sub-inhibitrices sont variables d'un antibiotique à l'autre et, à titre d'exemple, on retiendra :

- L'induction de virulence chez *Escherichia coli* O157:H7 par la norfloxacine à 200 ng.mL^{-1} (CMI : 250 ng.mL^{-1}) avec la production de shigatoxine STX (Herold *et al.*, 2005).
- Une réduction de la mobilité chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* en présence de mupirocine en concentrations sub-inhibitrices par réduction de la production de flagelline (Horii *et al.*, 2003).
- Une stimulation de la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*, par la tobramicine dès $0,1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CMI : $1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou, chez cette même bactérie, la stimulation de la production d'alginate d'un facteur 20 par l'imipénème à $1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CMI $2\text{-}4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Hoffman *et al.*, 2005 ; Bagge *et al.*, 2004).
- Finalement, l'induction du transfert de gènes comme par exemple chez *Bacteroides* où la tétracycline à dose sub-inhibitrice stimule le transfert d'éléments génétiques mobiles de la famille CTn-DOT, porteurs des gènes de résistances, par un facteur 1000 à 10000 (Salyers *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2005).

3. Effets des antibiotiques sur les transferts de gènes de résistance aux antibiotiques

Actuellement il existe encore peu de données quant à l'implication des antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices comme stimulateurs du transfert de gènes de résistance. L'action des antibiotiques peut se situer à différents niveaux, impliquant différents mécanismes. Tout d'abord la facilitation du transfert de gènes de résistance aux antibiotiques par transfert conjugatif. On peut citer les travaux de Trieu-Cuot *et al.* (1993) qui ont montré qu'en concentrations sub-inhibitrices l'oxacilline et la pénicilline G, présentes dans un milieu de culture, augmentaient d'un facteur 50 le transfert du plasmide pAT18 entre *E. coli* et *S. aureus* et entre *E. coli* et *L. monocytogenes*. Ces antibiotiques agissent en fragilisant la membrane bactérienne. En effet, ces pénicillines vont influencer sur la structure des peptidoglycanes de la paroi bactérienne par inhibition des transpeptidases. Il en résulte une augmentation de la perméabilité cellulaire qui facilite l'élaboration de contacts cellulaires nécessaires à la conjugaison (Courvalin, 2008). Des observations similaires ont été rapportées sur le rôle inducteur de faibles concentrations d'oxacilline qui augmentent le transfert *in vitro* du transposon conjugatif Tn916 entre *E. faecalis* et *B. anthracis* (Ivins *et al.*, 1988). Ajoutons à cela que des études ont montré que cet effet des pénicillines sur la perméabilité cellulaire favorisait également l'intégration de plasmides par transformation chez *E. faecalis* et *L. monocytogenes* (Cruz-Rodz *et al.*, 1990 ; Park *et al.*, 1990)

D'autres études ont montré l'action des antibiotiques en doses sub-inhibitrices comme inducteurs des transferts conjugatifs d'éléments génétiques mobiles porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques. Par exemple, l'exposition à des concentrations de tétracycline comprises entre 1 et 0,2 mg.L⁻¹ augmente de 10 à 100 fois le transfert du transposon Tn1545 (portant des gènes de résistance à la tétracycline), que ce soit dans des expériences *in vitro* ou dans le tractus intestinal de souris gnotobiotiques (souris spécialement élevées dans un environnement contrôlé, de manière à ce que leur microflore intestinale associée soit spécifique et connue) (Doucet-Populaire *et al.*, 1991). Ces observations ont été confirmées avec le transposon Tn925 dont la fréquence de transfert est multipliée par 10 chez *E. faecalis* en présence de faibles concentrations de tétracycline (Torres *et al.*, 1991). Enfin l'ajout de tétracycline dans le milieu de culture de *B. subtilis* augmente la fréquence de transfert de Tn916, qu'il contient, de 19 à 120 fois vers *B. thuringiensis*. Il en est de même lorsque la bactérie donneuse est *E. faecalis* avec une fréquence de transfert 15 fois supérieure à celle constatée en absence de tétracycline (Showsh *et al.*, 1992).

Qu'il s'agisse de Tn916 ou CTnDOT, il a pu être montré que la tétracycline régulaient le transfert des éléments mobiles via un mécanisme d'atténuation. D'autres mécanismes sont connus, impliquant par exemple des réponses au stress. A titre d'exemple, on sait que chez *E. coli* et *V. cholerae* la mytomycine C (20 à 200 ng.mL⁻¹) ou des fluoroquinolones comme la ciprofloxacine (1 à 10 ng.mL⁻¹) entraînaient la surexpression des gènes nécessaires au transferts de l'élément mobile SXT (élément mobile conjugatif de type ICEs (integrating conjugative elements) codant des résistances aux sulfamides, à la streptomycine, au chloramphénicol et au thrimétoprime) après qu'un represseur spécifique ait été inactivé suite à l'induction du système SOS (Bearber *et al.*, 2003).

La conjugaison n'est pas le seul mécanisme de transfert connu comme étant induit par les antibiotiques. D'autres études ont mis en évidence l'action d'antibiotiques sur l'induction de la transformation. La transformation nécessite que la bactérie soit dans un état physiologique dit de « compétence ». Prudhomme *et al.* (2006) ont mis en évidence que de faibles concentrations de mitomycine C (60 ng.mL⁻¹) ou de norfloxacine (10 µg.mL⁻¹) étaient capables d'engendrer un état de compétence chez *Streptococcus pneumoniae*.

Les antibiotiques exercent des effets sur les bactéries et les transferts de gènes de résistance même à des concentrations sub-inhibitrices typiquement observées dans l'environnement.

Sans en avoir une vision exhaustive, il apparaît clairement que de nombreux antibiotiques ont un effet positif sur la dissémination de gènes de résistance, que ce soit à travers la pression sélective qu'ils exercent ou à travers leurs effets stimulateurs à concentrations sub-inhibitrices. En remplaçant les antibiotiques dans le contexte environnemental, on peut se demander si certains environnements comme la STEP, ne sont pas plus exposés que d'autres aux effets potentiellement exercés par les antibiotiques. Reste encore à déterminer lesquels et à quelles concentrations.

V. Antibiotiques : consommation et devenir en station d'épuration

1. Consommation en médecine humaine

La consommation d'antibiotiques en médecine humaine influence de façon prédominante les concentrations d'antibiotiques retrouvés dans les STEP. La France est l'un des pays où le taux de prescriptions d'antibiotiques était ces dernières années le plus élevé en Europe. Ainsi, en 2003, la consommation de principes actifs antibiotiques, toutes familles chimiques confondues en médecine humaine s'élevait à environ 728 tonnes (Bergogne-Bérézin, 2004).

La majeure partie des molécules prescrites appartient aux familles des pénicillines et des macrolides en des proportions respectives de 50% et 18% des prescriptions totales (Figure 8) (Ferech *et al.*, 2006). Cette tendance est représentative des prescriptions antibiotiques dans les autres pays européens (Elseviers *et al.*, 2006) où les antibiotiques les plus prescrits appartiennent systématiquement à ces deux classes de molécules. À cet égard, la roxithromycine et l'amoxicilline font partie des dix molécules les plus prescrites au cours des huit dernières années en France et en Europe (Ferech *et al.*, 2006).

Considérant leur abondante utilisation, ces deux familles d'antibiotiques ont retenu notre attention et suscité une recherche de documentation particulière quant à leur devenir en STEP.

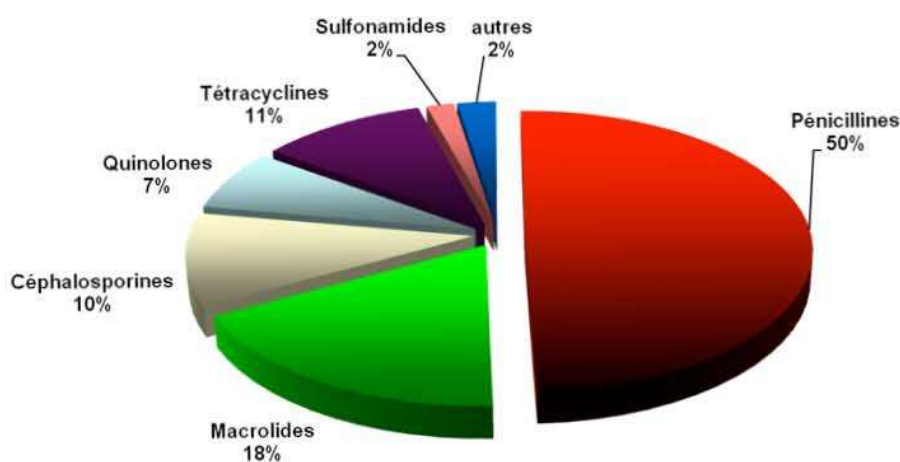


Figure 8 : Répartition des prescriptions d'antibiotiques par classes de molécules en médecine humaine au cours de l'année 2003 (Ferech *et al.*, 2006).

2. Devenir en station d'épuration

Après leur excrétion de l'organisme, les antibiotiques rejoignent les réseaux d'eaux usées urbaines, et leurs flux varient selon la ville (structure des réseaux ; présence d'un hôpital ; ...) mais aussi la saison avec une augmentation marquée en hiver due à une consommation plus importante de ces substances (Göbel *et al.*, 2005b ; Ferech *et al.*, 2006). Une fraction des antibiotiques est adsorbée à la surface des biofilms/agrégats biologiques et ou dégradée au cours de son passage dans le réseau.

Au niveau de la STEP, les antibiotiques subissent simultanément des phénomènes de solubilisation, d'adsorption et de dégradation biologique et/ou physico-chimique (Joss *et al.*, 2005).

À la sortie du bassin biologique et en sortie de clarificateur, les concentrations d'antibiotiques dissous dans l'effluent varient de quelques dizaines de nanogrammes par litre au

microgramme par litre (Hirsch *et al.*, 1999 ; Kümmerer *et al.*, 2000 ; Ternes *et al.*, 2004) et ces concentrations sont toujours très largement inférieures aux CMI connues (Concentrations minimales inhibitrices) pour ces molécules comme on peut le voir dans les tableaux II et III.

Tableau II : Concentrations minimales inhibitrices et concentrations d'antibiotiques dans les eaux usées de différentes stations d'épuration

Antibiotiques	Classes	CMI** µg.L ⁻¹	Concentrations en antibiotique dans les eaux usées de STEPs	
			Concentrations en µg/l	Références
Clarithromycine	Macrolide	15 à 128 000	0,24 0,26 0,057 à 0,33	Hirsch <i>et al.</i> , 1999 Göbel <i>et al.</i> , 2005 (b) McArdell <i>et al.</i> , 2003
Erythromycine		15 à 128 000	6 à 2,5 0,07 0,11 à 0,2	Hirsch <i>et al.</i> , 1999 Göbel <i>et al.</i> , 2005 (b) McArdell <i>et al.</i> , 2003
Roxithromycine		15 à 32 000	1 à 0,68 0,1 à 0,066 0,015 0,011 à 0,031	Hirsch <i>et al.</i> , 1999 Ternes <i>et al.</i> , 2004 Göbel <i>et al.</i> , 2005 (b) McArdell <i>et al.</i> , 2003
Amoxicilline	Pénicilline	15 à 64 000	<LD	Hirsch <i>et al.</i> , 1999
Ampicilline		Nd	Nd	
Pénicillines V		Nd	Nd	
Pénicillines G		8 à 64 000	Nd	
Chloramphénicol	Phénicolé	30 à 64 000	0,56	Hirsch <i>et al.</i> , 1999
Sulfaméthoxazole	Sulfamide	Nd	2 à 0,4 1,7 à 0,4	Hirsch <i>et al.</i> , 1999 Göbel <i>et al.</i> , 2005 (b)
Triméthoprim	Pyrimidine	Nd	0,66 à 0,32 0,29 à 0,07	Hirsch <i>et al.</i> , 1999 Göbel <i>et al.</i> , 2004
Tétracycline	Tétracycline	8 à 128 000	0 à 4	Karhikeyan et Bleam, 2003
Oxytétracycline		Nd	Nd	
Ciprofloxacine	Fluoroquinolone	<1,65 à 128 000	0,071 0,095 ± 0,015	Stumpf <i>et al.</i> , 1999 Golet <i>et al.</i> , 2003
Norfloxacine		500 à 64 000*	0,051 0,069 ± 0,015	Stumpf <i>et al.</i> , 1999 Golet <i>et al.</i> , 2003

Nd : non documenté ; LD : limite de détection ; * : données obtenues qu'à partir de 4 souches bactériennes.

Göbel *et al.*, : concentrations déterminées à partir de stations d'épuration en Suisse ; **Golet *et al.***, concentrations déterminées à partir de stations d'épuration de Zurich-Werdhölzi (Suisse) ; **Hirsch *et al.***, : concentrations déterminées à partir d'échantillons de stations d'épuration en Allemagne ; **Karhikeyan et Bleam**, : concentrations déterminées à partir de stations d'épuration du Wisconsin (Etats-Unis) ; **McArdell *et al.***, : concentrations déterminées à partir de station d'épuration en Suisse, **Ternes *et al.***, concentrations déterminées à partir de stations d'épuration européennes pour le projet poséidon.

** Les CMI présentées sont celles mesurées par le **Laboratoire de Bactériologie Clinique de la Faculté de Pharmacie de Lille**. Elles ont été établies en testant plusieurs espèces bactériennes différentes.

http://pharmacie.univlille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/base_de_donnees/interrogationBD

Les concentrations en roxithromycine sont probablement plus importantes dans les stations d'épuration françaises, le taux de prescriptions en France étant largement plus élevé.

Tableau III: Abattement des concentrations d'antibiotiques dissous dans les effluents de stations d'épuration et dans la boue sèche (Suisse) (Göbel *et al.*, 2005. ; Golet *et al.*, 2003)

Antibiotique	Concentrations d'antibiotiques dissous $\mu\text{g.L}^{-1}$			Concentrations dans la boue activée ($\mu\text{g/kg}$ de boue sèche)
	Effluent brut	Effluent secondaire	Effluent final	
Sulfaméthoxazole (1)	0,43	0,28	0,29	68 ± 20
N-Acétylsulfaméthoxazole (2)	1,4	0,04	0,01	Nd
(1)+ (2)	1,7	0,38	0,40	Nd
Triméthoprim	0,29	0,20	0,07	41 ± 15
Azithromycine	0,17	0,14	0,16	64 ± 30
Erythromycine	0,07	0,08	0,07	Nd
Clarithromycine	0,38	0,26	0,24	67 ± 28
Roxithromycine	0,02	0,02	0,01	Nd
Ciprofloxacine	0,48	0,09	0,071	2500
Norfloxacine	0,43	0,07	0,051	2600

Etude réalisée sur trois stations d'épuration en Suisse ; effluent brut : Eaux usées entrant en station ; **Effluent secondaire :** eaux usées prélevées en sortie de bassin biologique ; **Effluent final :** échantillons prélevés en sortie d'installation après filtration sur sable ; **Nd :** non détecté ; **Nombre d'échantillons dosés :** 15.

Les données présentées dans ces tableaux, à l'exception d'une seule (la concentration en tétracycline), sont toutes issues d'études réalisées en Europe. Aucune donnée sur les concentrations en antibiotiques dans les STEP aux Etats Unis n'a été prise en compte pour notre étude car le profil des consommations des antibiotiques y est très différent.

Le sulfaméthoxazole est moins résistant à la dégradation et l'on pourrait s'attendre à trouver des concentrations relativement basses en STEP (Göbel *et al.*, 2004). Pourtant les concentrations en sulfaméthoxazole dans les effluents de sortie de station peuvent être relativement élevées. Lors de son excrétion de l'organisme, sa forme prédominante est un métabolite secondaire N-acétylé. Néanmoins la biotransformation étant réversible, les concentrations mesurées seraient le résultat d'une néogenèse du principe actif initial (McArdell *et al.*, 2003). Par conséquent une « grande » concentration de sulfaméthoxazole peut persister en solution dans les eaux. Les deux fluoroquinolones les plus utilisées en Europe sont la ciprofloxacine et la norfloxacine. Ces composés sont très largement éliminés dans les boues et ceci dès les premières étapes de traitement des eaux. Or si l'on observe les données de Golet *et al.* (2003), bien que leur concentration diminue dans les effluents, la concentration dans les boues activées est très élevée et varie de 2500 à 2600 $\mu\text{g/kg}$ de boues activées sèches.

En conclusion, les antibiotiques consommés en médecine humaine excrétés en grande proportion dans les urines et les fèces - sans modification ou métabolisation pour certaines familles chimiques - se retrouvent en concentrations libres (dissous) de l'ordre du nanogramme à quelques dizaines de nanogrammes par litre d'eaux usées. Ces concentrations

100 à 1000 fois inférieures aux CMI sont perçues par de nombreux microorganismes qui « répondent » à ces stimuli. L'effet de ces antibiotiques sur le transfert de gènes reste à explorer plus précisément afin de comprendre l'impact de ces « micropolluants » non pas sur le fonctionnement des stations d'épuration mais sur les risques de dissémination des gènes dans/via la station d'épuration d'eaux usées urbaines.

Partie II : Matériels et Méthodes

I. Cultures bactériennes et conjugaisons

1. Culture des souches bactériennes et milieu de croissance

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont décrites dans le tableau IV. Les cultures ont été réalisées en milieu riche LB (« LB-Miller », Difco). Pour les milieux solides, de l'agar a été ajouté à 15 g.L⁻¹.

Tableau IV : Souches bactériennes

Identifiant	Souche / Noms	Génotypes ^a / Caractéristiques ^b	Références / Origines
<i>Cupriavidus metallidurans</i>			
CM49	<i>Cupriavidus metallidurans</i> AE815	Rif ^r	Springael <i>et al.</i> , 1993
<i>Cupriavidus necator</i>			
CM121	JMP228::lacI ^q	Rif ^r	De Gelder <i>et al.</i> , 2005
<i>Escherichia coli</i>			
CM30	HB101/pRK600	Plasmide helper pour mutagenèse avec mini-Tn7 et mini-Tn5 Cm ^r	Kessler, 1992
CM32	JB120 = MV1190(λpir)[pJBA28]	Δ(lac-proAB) Δ(srl-recA)306::Tn10 [F' traD36 proAB lacIq (lacZ)M15] thi supE λpir MV1190 λpir donneuse pour mini-Tn5 Km Plac gfp (sur plasmide pJBA28) Km ^r	Andersen <i>et al.</i> , 1998
CM53	MG1655	Dérivée F ⁻ et λ ⁻ de K12, souche séquencée	Blattner <i>et al.</i> , 1997
CM55	DH5α	φ80 lacZΔM15 recA1 endA1 gyrA96 (Nal ^r) thi-1 hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
CM102	DH5α / pB10	Amx ^r , Nal ^r , Str ^r , Sul ^r , Tet ^r	Schlüter <i>et al.</i> , 2003
CM125	MG1655	Mutant Nal ^r de CM53	Collection LCPME
CM155	JM109	recA1 endA1 gyrA96 (Nal ^r) thi hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB)/F'[traD36 proAB+lacIq lacZ ΔM15]	Miller <i>et al.</i> , 1992
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
CM150	PAO1	Type sauvage	Holloway et Morgan, 1986
<i>Pseudomonas putida</i>			
CM118	SM1443	Rif ^r Dérivée de KT2442 (=KT2440 Rif) avec un Tn5-lacI ^q	Christensen <i>et al.</i> , 1998
<i>Sinorhizobium meliloti</i>			
CM122	RM1021::lacI ^q	Rif ^r	De Gelder <i>et al.</i> , 2005

(a) les descriptions respectent les nomenclatures génétiques en vigueur

(b) Amx^r, Km^r, Nal^r, Rif^r, Str^r, Sul^r, Tet^r résistances à l'amoxicilline, la kanamycine, l'acide nalidixique, la rifampicine, la streptomycine, le sulfaméthoxazole et la tétracycline respectivement.

Les bactéries utilisées ont été cultivées en routine à 30°C en étuve pour les cultures sur milieu solide et en bain marie agitant (bain INOVA 3100, New Brunswick) ou sur plateau agitant en chambre chaude, sous agitation à 160 rpm pour les cultures liquides. Sauf exceptions (spécifiées dans le texte), une pression de sélection a été maintenue en culture au moyen d'antibiotiques : rifampicine (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), tétracycline (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), kanamycine (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), acide nalidixique (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), streptomycine (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

2. Dénombrement bactérien et évaluation de la sensibilité aux antibiotiques

La souche bactérienne à tester a été cultivée en milieu LB à 30°C pendant environ 16 heures sous agitation à 160 rpm. Après culture, les bactéries ont été lavées 2 fois dans du MgSO_4 10 mM (un cycle de lavage correspond à : une centrifugation à 8 000 g pendant 1 minute – l'élimination du surnageant – la dispersion du culot dans 1 volume de MgSO_4 10 mM), et remise en suspension dans un volume final de 1,5 mL de MgSO_4 à 10 mM. La suspension cellulaire a été diluée en cascade (100 μL de suspension cellulaire dans 900 μL de MgSO_4 à 10 mM) puis 100 μL de chaque dilution ont été étalés avec des billes de verre stériles sur un milieu LB gélosé contenant des concentrations en antibiotiques définies. Les colonies formées ont été dénombrées après 24 et 48 heures de croissance à 30°C. Selon l'aspect de la croissance, les colonies ont à nouveau été dénombrées 1 à 2 fois supplémentaires afin de vérifier que le maximum d'UFC (Unité Formant Colonie) ait été formé. Pour chaque étalement de 100 μL , les comptages ont été réalisés pour des dilutions présentant 30 à 300 colonies. Le nombre de bactéries cultivables a été calculé selon la relation suivante :

Nombre de bactéries cultivables (UFC/mL) = nombre des colonies $\times$ coefficient de dilution $\times$ volume déposé

3. Cinétique de croissance bactérienne en milieu liquide

Les bactéries étudiées ont été préalablement pré-cultivées pendant 16 heures à 30°C, sous agitation (160 rpm) en milieu LB supplémenté avec le ou les antibiotiques *ad hoc* permettant leur sélection. Ces précultures ont alors été utilisées pour inoculer 100 mL de milieu LB (en erlen de 500 mL) maintenues à 30°C sous agitation à 160 rpm dans un bain marie INOVA 3100 (New Brunswick). L'évolution de la biomasse a été suivie spectrophotométriquement à 600 nm à intervalle de temps régulier.

4. Conjugaisons bactériennes

4.1. Conjugaisons sur boîte

Les bactéries donneuses (possédant le plasmide d'intérêt) et les bactéries receveuses ont été cultivées séparément pendant 16 heures à 30°C, sous agitation (160 rpm) en milieu LB liquide supplémenté avec le ou les antibiotiques permettant de sélectionner chaque bactérie. Ces bactéries ont été lavées 2 fois par centrifugation et remises en suspension indépendamment dans une solution de MgSO₄ (10 mM). 50 µL de chacune des suspensions ont alors été mélangés sur une boîte de milieu LB gélosé et incubés 16 heures à 30°C. Après conjugaison, les bactéries du mélange ont été suspendues dans 900 µL de MgSO₄ (10 mM) et diluées en série avant d'être étalées sur des milieux sélectifs permettant de sélectionner les bactéries transconjugantes (bactéries receveuses ayant reçu le plasmide à l'issue de la conjugaison bactérienne). Après croissance à 30°C, les colonies bactériennes sélectionnées ont éventuellement été dénombrées et purifiées sur le même milieu sélectif. Certains plasmides ne codent pas pour leurs propres fonctions de transfert mais restent cependant mobilisables si ces fonctions sont apportées en *trans* grâce à une souche auxiliaire dans un croisement dit « triparental ». Pour de tel transfert la souche auxiliaire a été préparée comme décrit pour les deux autres et ajoutée au mélange de souches donneuses plus receveuses.

4.2. Conjugaisons « sur filtre »

La conjugaison sur filtre a été réalisée à partir de cultures préparées comme indiqué précédemment (voir conjugaisons « sur boîte »). A l'issue du lavage des cellules, les suspensions de bactéries donneuses et receveuses ont été mélangées dans un microtube (même volume de chaque suspension), et 100 µL du mélange ont été déposés sur un filtre stérile de nitrocellulose à 0,45 µm de porosité (filtre Millipore de type HA, Ref. HAWG047A0), lui-même disposé sur une boîte de milieu gélosé (pré-incubée à la température de conjugaison désirée). Après incubation à la température désirée (22 ou 30°C) et sur la durée voulue (1, 2, 3, 4, 5 ou 24 heures), le filtre contenant la biomasse bactérienne a été récupéré à l'aide de pinces flambées à l'alcool, puis plongé dans 900 µL de MgSO₄ 10 mM. Les bactéries du filtre ont été dispersées dans la solution par agitation (vortex) et diluées en série avant d'être étalées, comme précédemment, sur des milieux sélectifs permettant de sélectionner les bactéries donneuses, receveuses et/ou transconjugantes.

5. Inductibilité de la fluorescence codée par les plasmides pB10::mini-Tn5-*gfp*

Les bactéries transformées avec un plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp* ont été cultivées sur LB gélosé ou en LB en présence et en absence d'IPTG à 400 μ M (isopropyl- β -D-thiogalactoside) et observées en microscopie de fluorescence. Quelques colonies de cellules fraîchement cultivées sur milieu gélosé (24-48 heures de croissance) ont été collectées et remises en suspension dans 10 μ L d'H₂O ou de MgSO₄ 10 mM. La suspension a été placée entre lame et lamelle couvre-objet puis observée à l'objectif à immersion $\times 100$ en contraste de phase et en microscopie de fluorescence (λ_{EX} = 488 nm - filtre d'émission : λ_{EM} = 515 $\pm$ 15 nm) avec un microscope à épifluorescence Olympus BX 51. Pour les bactéries cultivées en LB, les cultures ont été lavées 2 fois par centrifugation et remises en suspension dans une solution de MgSO₄ (10 mM). Un volume de 100 μ L a été prélevé et observé selon le protocole défini auparavant.

II. Origines et échantillonnage des matrices environnementales pour les expérimentations en microcosmes

1. Boues de station d'épuration

1.1. Origines et échantillonnage

Les boues de station d'épuration (STEP) destinées aux expérimentations en microcosmes ont été prélevées dans 4 stations d'épuration à procédé boues activées. La première se situe en Meurthe et Moselle à Neuves-Maisons et présente une capacité de traitement de 30 000 équivalents habitants répartis en deux chaînes. Les trois autres sont localisées dans la région parisienne à Plaisir, Maurepas (Yvelines) et Corbeil-Essonnes (Essonnes) et présentent des dimensions respectives de 20 000, 30 000 et 250 000 équivalents habitants. Dans ces 4 STEP les eaux usées traitées sont des eaux usées urbaines d'origines mixtes domestiques et industrielles. En outre, les STEP de Corbeil-Essonnes, Neuves Maisons et Plaisir drainent des eaux hospitalières. Par ailleurs, Plaisir reçoit également les eaux de lessivage de l'incinérateur proche.

Différents types de boues ont été prélevés à différentes étapes du processus épuratoire selon la STEP considérée (les différents sites de prélèvements en fonction des étapes de traitement de la STEP sont schématisés sur la figure 9) :

- Des boues biologiques ont été prélevées à Neuves-Maisons au niveau de la station de relevage des boues (avant le décanteur secondaire, Figure 9-1), et à Plaisir et Maurepas directement dans le bassin biologique (Figure 9-2).
- Des boues biologiques décantées (en sortie de décanteur secondaire, Figure 9-3), des boues primaires (au niveau du décanteur primaire, Figure 9-4) et des boues anaérobies (au niveau du digesteur anaérobie, Figure 9-5) ont été obtenues à partir de la station de Corbeil-Essonnes
- Des disques de polyéthylène colonisés par de la biomasse (Kaldnes[®]) ont été prélevés au niveau du bassin d'aération d'un réacteur à lit mobile (« moving Bed Reactor ») sur la nouvelle unité d'épuration de la STEP de Corbeil-Essonnes (Figure 10).

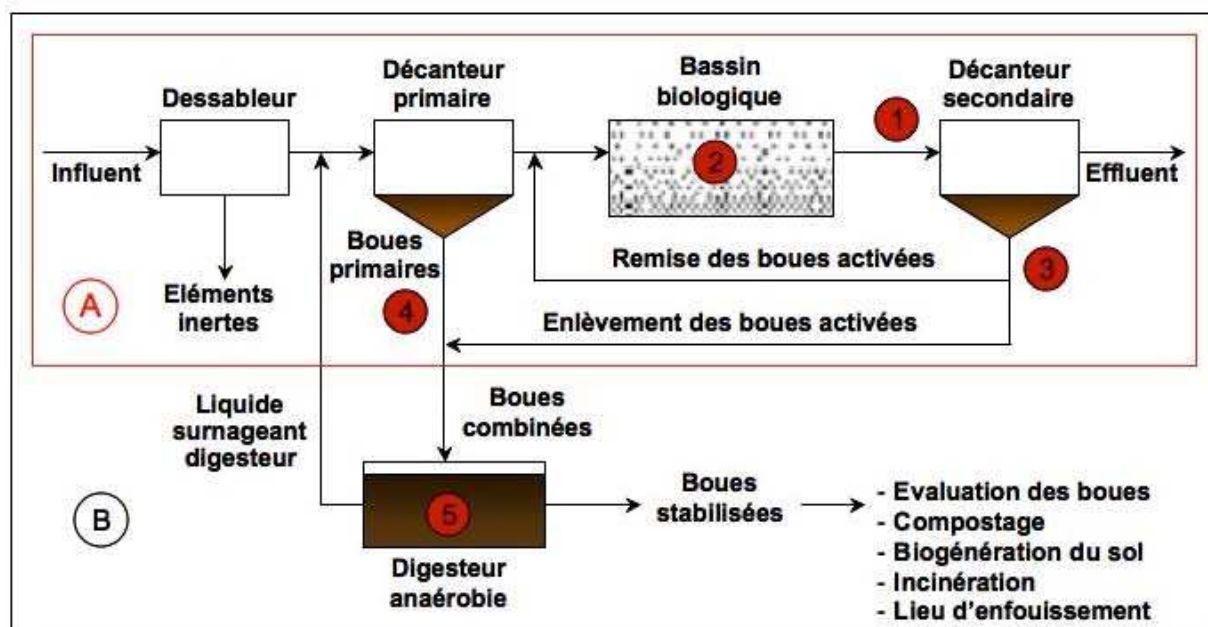


Figure 9 : Schéma général des étapes de traitement de la STEP et localisation des différents points de prélèvements. A : Etapes de traitement présentes dans les STEP de Neuves-Maisons, Plaisir et Maurepas - B : Etapes de traitement présentes dans la STEP de Corbeil-Essonnes - 1 : site de prélèvement des boues biologiques à Neuves-Maisons (station de relevage) - 2 : sites de prélèvement des boues biologiques à Maurepas et Plaisir (bassin biologique) - 3 : site de prélèvement des boues biologiques décantées à Corbeil-Essonnes (sortie de décanteur secondaire) - 4 : site de prélèvement des boues primaires à Corbeil-Essonnes (sortie de décanteur primaire) - 5 : site de prélèvement des boues anaérobies à Corbeil-Essonnes (digesteur anaérobie).

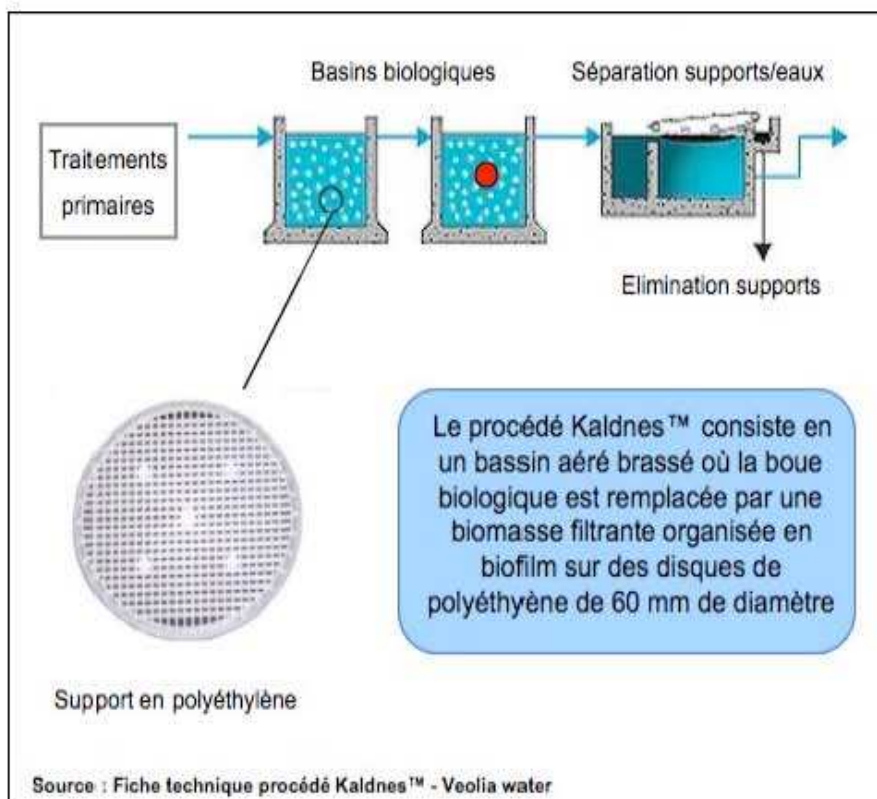


Figure 10 : Principe du procédé Kaldnes™ présent sur la seconde chaîne de traitement de la STEP de Corbeil-Essonnes. Le point de prélèvement est représenté en rouge.

Pour chaque campagne de prélèvement, les échantillonnages ont été réalisés comme suit. Les boues biologiques et les biomasses fixées sur Kaldnes ont été prélevées par volumes de 20 L, conditionnées dans des bidons de polyéthylène préalablement rincés avec 1 L de boues biologiques (ou de surnageant pour le procédé Kaldnes). Les échantillons de boues anaérobies et boues biologiques décantées ont été conditionnés en volumes de 80 mL dans des bidons de 1 L d'où l'air a été chassé afin de compenser la libération de gaz générée par l'activité de la biomasse. Les échantillons prélevés ont été maintenus à température ambiante pendant la durée du transport (2 heures maximum), puis à 20°C pour l'ensemble des mesures effectuées, les traitements des échantillons et leur utilisation en microcosme (laboratoires thermostatés à une température constante de 20°C). Le temps écoulé entre le prélèvement et l'utilisation des boues dans les microcosmes varie de 1 à 3 heures en tenant compte des transports et du conditionnement des boues pour les essais.

1.2. Caractérisation physico-chimique des boues prélevées

Les boues échantillonnées en STEP ont fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique en mesurant les paramètres suivants : pH, température (pHmètre Hanna instruments pH211

microprocessor pH Meter – sondes Bioblock 90437) et $[O_2]$ dissous (Oximètre WTW OXI 340 – sonde OxiCal® - SL) au moment du prélèvement.

- Volume de sédimentation à 30 minutes (V30) : La mesure est réalisée dans une éprouvette de 1 L et consiste à relever la hauteur du voile de boue dans l'éprouvette. Un échantillon de boue homogène et représentatif du bassin d'aération est prélevé pour remplir une éprouvette avec un litre de boue remise en suspension par retournements afin de ne pas perturber la structure du floc. Après 30 minutes, noter le niveau du voile de boue (interface boue-eau) dans l'éprouvette. Le résultat obtenu est exprimé en $mL.L^{-1}$. Cette valeur, notée V30, doit impérativement être comprise entre 100 et 300 mL. Dans le cas contraire, l'éprouvette est vidée et le test est répété avec une boue diluée avec l'eau clarifiée issue de la boue prélevée. Si nécessaire ce test doit être répété avec des dilutions plus importantes (1/4 de boue, 1/5,...) jusqu'à obtenir les conditions de validité du test (entre 100 et 300 mL de volume décanté après 30 minutes).

- Matières sèches en suspension (MES) : 20 mL de boues homogénéisées par retournements sont séchés à 120°C pendant 24 h (ou jusqu'à obtention d'une masse constante). Les matières sèches sont déterminées par pesées différentielles des coupelles avant et après évaporation de la phase aqueuse des boues.

- Matières volatiles en suspension (MVS) : Elles sont déterminées en pesant la masse résiduelle de l'échantillon utilisé pour estimer les MES après sa calcination au four à 550°C pendant 3 heures. Les coupelles sont pesées avant et après calcination et la perte de poids correspond aux matières sèches volatiles.

- Calcul de l'indice de boue (IB) ou indice de Mohlmann : L'indice de boue représente le volume occupé par un gramme de boue après trente minutes de décantation dans une éprouvette d'un litre. Il est calculé en formant le rapport du volume de boues décantées après trente minutes avec la concentration en MES de l'échantillon introduit dans l'éprouvette, il est exprimé en $mL.g^{-1}$.

$$IB = V30 / [MES]$$

L'ensemble de ces mesures effectuées sur les différents prélèvements sont présentées dans le tableau V. Pour chacun de ces paramètres, des valeurs limites acceptables ont été déterminées en consultation avec le pôle ingénierie du CIRSEE : $[O_2]$ dissous comprise entre 2 et 4 $mg.mL^{-1}$; Volume de sédimentation (V30) compris entre 100 et 300 $mL.L^{-1}$; Matières en sus-

Tableau V : Caractéristiques physico-chimiques des boues prélevées

STEP	Corbeil-Essones (Boues biologiques)	Corbeil-Essones (Boues anaérobies)	Corbeil-Essones (Kaldnes)	Maurepas	Neuves-Maisons	Plaisir	Critères qualité définis
Période de prélèvement	06/04/09	06/04/09	15/04/09	03/10/08 10/10/08 23/10/08	03/04/08 02/06/08 30/06/08 21/07/08 07/08/08 09/06/09	03/10/08 10/10/08 23/10/08	
pH	7,3	8	7,1	7,06 7,89 7,6	7,39 7,17 7,01 7,02 6,98 7,19	7 7,3 7,5	
Température (°C)	21	35	15	21 20 18	12,1 13,9 18,8 21,5 21 19,5	18,7 19 18	
[O ₂] dissous (mg.mL ⁻¹)	ND	-	2,3	2,2 2,1 2,1	2 1,6 2,9 1,5 1,34 1,43	2 3 2,8	2- 4
Volume de sédimentation (V30) (mL.L ⁻¹)	ND	-	-	230 (d½) 230 (d½) 200 (d ½)	200 250 (d ¼) 290 280 298 245	190 (d½) 200 (d½) 195 (d½)	100 - 300
Matières en suspension (MES) (g.L ⁻¹)	ND	ND	ND	4,88 ± 0,15 4,10 ± 0,07 4,52 ± 0,08	3,99 ± 0,07 6,44 ± 0,08 3,41 ± 0,08 3,40 ± 0,06 3,55 ± 0,11 4,23 ± 0,27	4,68 ± 0,08 3,86 ± 0,13 3,71 ± 0,05	3 – 4
Matières volatiles en suspension (MVS) (g.L ⁻¹)	ND	ND	ND	3,57 ± 0,10 3,39 ± 0,11 3,45 ± 0,14	1,98 ± 0,04 3,30 ± 0,05 1,69 ± 0,06 1,75 ± 0,05 2,01 ± 0,05 2,28 ± 0,11	2,66 ± 0,06 2,72 ± 0,13 2,69 ± 0,09	50 à 70% des MES
Indice de boues (IB) (mL.g ⁻¹)	ND	-	-	94 112 88	50 155 85 82 84 80	81 103 105	80 – 150

D : dilution ; ND : Non déterminé ; - : non mesurable

-pension [MES] comprise entre 3 et 4 g.L⁻¹ ; Matières volatiles en suspension [MVS] représentant 50 à 70 % des MES ; Indice de boues (IB) compris entre 80 et 150 mL.g⁻¹. Ces valeurs garantissent la bonne qualité des boues utilisées pour les expériences ultérieures en microcosme et tout échantillon ne remplissant pas ces critères a été rejeté.

2. Sédiments de rivière

2.1. Origines et échantillonnage

Les prélèvements de sédiments ont été effectués dans la Moselle, une rivière située en Lorraine. Les échantillons ont été prélevés au niveau de Golbey (Vosges) en amont et au niveau de la sortie de rejet de la STEP de Golbey. Un troisième site a été échantillonné, au niveau de la sortie d'écoulement d'un trop-plein de bassin d'orage qui collecte les eaux de ruissellement de la zone d'activité industrielle de Golbey. Les points de prélèvements sont localisés sur la figure 11.

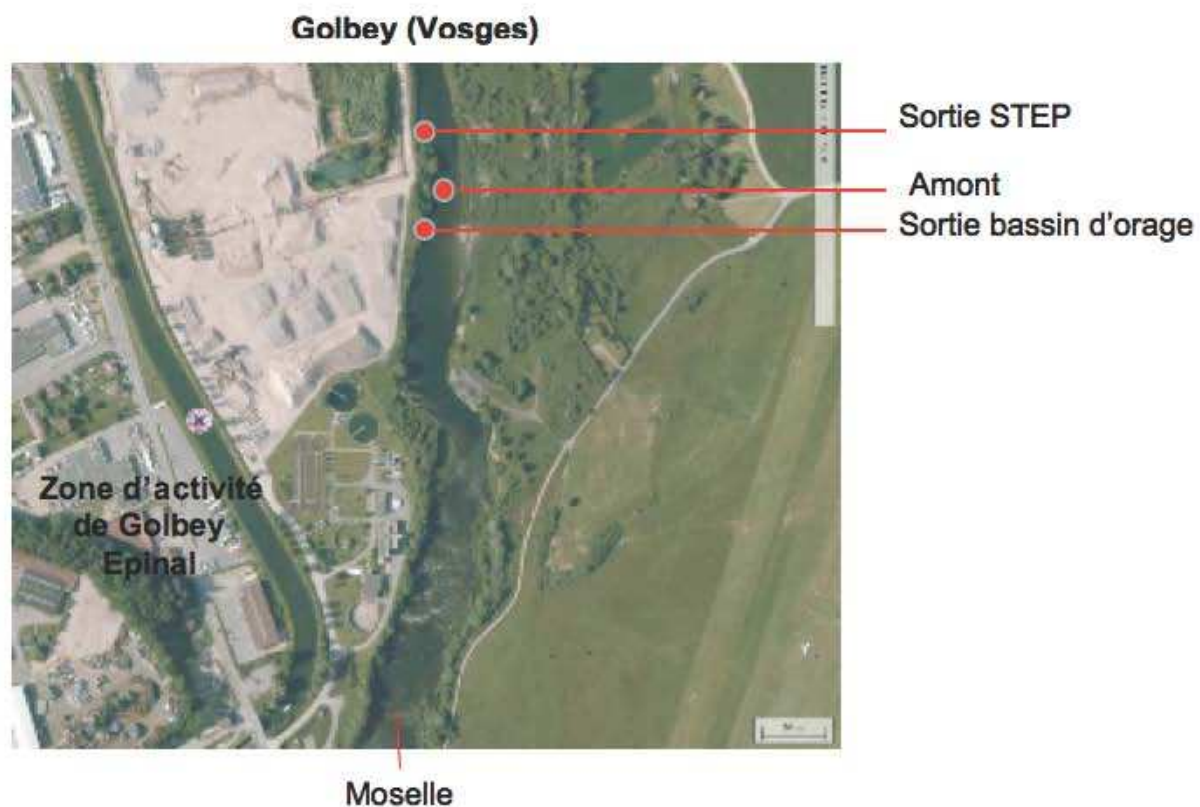


Figure 11 : Localisation des sites de prélèvements de sédiments dans la Moselle (Golbey, Vosges).

Pour chaque campagne d'échantillonnage, environ 2 L de sédiments ont été prélevés sur une profondeur de 20 cm et placés dans des containers de 5 L. Le volume restant a été complété avec l'eau de la rivière. Les échantillons ont été maintenus à température ambiante jusqu'à

l'arrivée au laboratoire (soit environ 2 heures), puis à température constante de 20°C au laboratoire pour les analyses et les expérimentations en microcosmes.

2.2. Caractérisation physico-chimique des sédiments

La concentration en oxygène dissous, le pH et la température de la colonne d'eau ont été mesurés comme pour les boues (voir § 1.2). A ces mesures s'est ajoutée la détermination de la demande chimique en oxygène (DCO). La DCO a ensuite servi à ajuster les apports en carbone dans les microcosmes en partant du principe que l'unique source de carbone en rivière est véhiculée dans le flux d'eau. La DCO a été estimée avec des tests en tube Spectroquant® (CSB/COD, Merck DCO), kits 1.14560.0001, 1.14540.0001 et 1.14541.0001 pour des gammes de DCO de 4-40 mg.L⁻¹, 10-150 mg.L⁻¹ et 100-1500 mg.L⁻¹, respectivement. Ces tests reposent sur l'oxydation des substances oxydables présentes dans l'échantillon d'eau à tester par le dichromate de potassium contenu dans les kits. En pratique, l'échantillon d'eau à analyser est introduit dans le tube contenant les réactifs puis incubé à 148°C pendant 120 minutes (thermoreaktor CR 3000 WTW). Après refroidissement le dosage photométrique de la concentration en ions Cr₂O₇²⁻ jaunes non consommés est réalisé par mesure d'absorbance à 348 nm l'aide d'un spectrophotomètre (Photometer MPR 3000 WTW).

Tableau VI : Caractéristiques physico-chimiques des colonnes d'eaux prélevées

Point de prélèvement	Amont (Am)	Sortie rejet STEP Golbey (STEP)	Sortie bassin orage (Sie)
Période de prélèvement	03/03/09	03/03/09	03/03/09
pH	6,88	6,45	6,73
Température (°C)	10	13	10
[O ₂] dissous (mg.mL ⁻¹)	2	2,1	1,4
Demande chimique en oxygène (mg.L ⁻¹)	12 ± 0,1	23 ± 0,05	14 ± 0,12

III. Montage et opération de microcosmes

Afin de mener les essais de persistance et dissémination du plasmide pB10 dans des matrices environnementales, il était indispensable de pouvoir maintenir les échantillons environnementaux en laboratoire pendant 5 jours successifs. Pour cela des microcosmes ont été élaborés et adaptés aux différents types de matrices envisagées.

1. Microcosmes de boues biologiques

Les boues prélevées en STEP ont été homogénéisées par retournements successifs puis dispersées par mélange à l'aide d'un mixeur (Waring, blender B010) à vitesse maximale pendant deux minutes. Pour chaque série de microcosmes 15 L de boues ont été mixés par volume de 600 mL avant d'être rassemblés et mélangés dans des erlenmeyers de 6L préalablement stérilisés, puis répartis dans différents types de montages selon le type de microcosme envisagés : microcosmes aérés/brassés ou microcosmes non aérés non brassés (Figures 12 et 13).

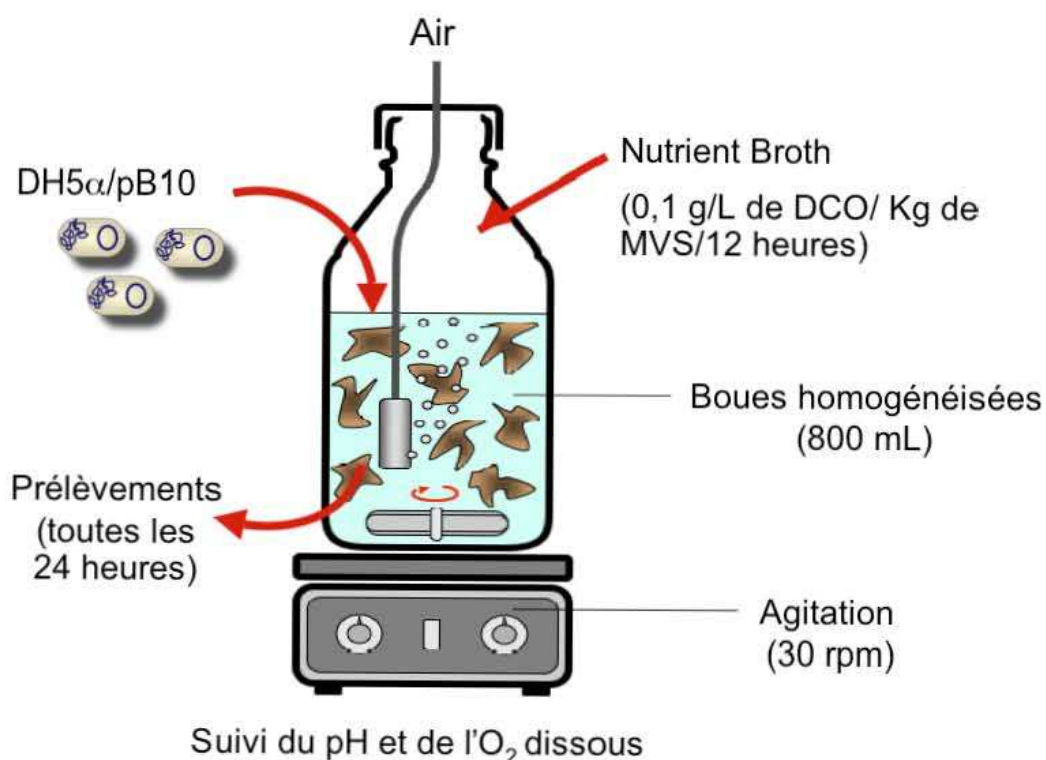


Figure 12 : Principe des microcosmes oxygénés - brassés.

Pour les microcosmes aérés/brassés, les boues mixées ont été préalablement homogénéisées par retournement et 800 mL ont été prélevés stérilement et mis dans un flacon Schott® stérile de 1 L. Les boues ont été aérées par bullage d'air compressé au moyen de sucres diffuseurs.

La qualité de l'air diffusé a été maintenue par un barbotage dans de l'eau déminéralisée ultrapure milliQ® dans deux vases d'expansion successifs, puis par filtration au travers d'une membrane hydrophobe stérile fluoropre de 0,2 µm de diamètre de pores (Millex®-FG) afin de prévenir l'apport de germes exogènes. Le débit d'air a été réglé de façon à maintenir une concentration en oxygène dissous comprise entre 2 et 4 mg.L⁻¹ dans les boues. Afin d'éviter la sédimentation d'une partie des boues au fond des flacons, un brassage additionnel a été assuré à l'aide d'un agitateur magnétique tournant à une vitesse de 30 rpm. Le dispositif a été maintenu dans ces conditions de brassage et d'aération pendant une heure avant inoculation avec le plasmide modèle pB10 (ADN nu ou porté par une bactérie donneuse) en laboratoire thermostaté à 20°C. (Figure 12).

Les microcosmes ont été maintenus 5 jours au laboratoire à 20 ± 0,5 °C avec un apport régulier en matière organique (« Nutrient Broth »). L'apport considéré comme optimum de matière organique d'une boue en STEP correspond à un équivalent de 0,2 g.L⁻¹ de DCO/kg de matières sèches volatiles / 24 h. Un apport nutritif comparable a été apporté aux microcosmes en ajoutant 60 µL d'une solution de « Bouillon Nutritif » (Difco) à 32 g.L⁻¹ pour chaque mL de boues (soit 1,9×10⁻³ g de Bouillon Nutritif par mL de boues), calculé pour correspondre à 0,1 g de DCO pour chaque kg de MES de boues. Pour limiter le gonflement des boues (ou bulking) lié la formation de mousse après addition de Bouillon Nutritif en milieu brassé, chaque apport a été accompagné de 50 µL d'antifoam B (gel de silicone antimoissant concentré à 100%, Sigma).

Pour les microcosmes non aérés - non brassés, un volume de 200 mL de boues préalablement traitées comme décrit précédemment a été placé en erlenmeyer stérile de 500 mL. Les microcosmes ont ensuite été laissés en l'état, sans aération ni brassage durant toute la durée de l'expérimentation. Une homogénéisation des boues par agitation a cependant été réalisée lors des apports de bouillon nutritif et lors des prélèvements journaliers de boues (Figure 13).



Microcosmes de boues biologiques brassées -
oxygénées



Microcosmes de boues biologiques non brassées - non
oxygénées

Figure 13 : Microcosmes de boues biologiques.

2. Microcosmes Procédé Kaldnes®

Concernant les échantillons prélevés en réacteur à lit mobile, seuls des microcosmes aérés – brassés ont été réalisés. Les disques colonisés par la biomasse ont été introduits dans des béchers stériles de 1L où ils ont occupés un volume égal à 600 mL. Le volume total a ensuite été ajusté à 1 L avec la phase aqueuse prélevée dans le bassin biologique d'origine. Les systèmes ont été aérés de la même façon que les boues biologiques, enrichis en éléments nutritifs selon le même protocole et maintenus dans les mêmes conditions de température, d'aération et de brassage (Figure 14).

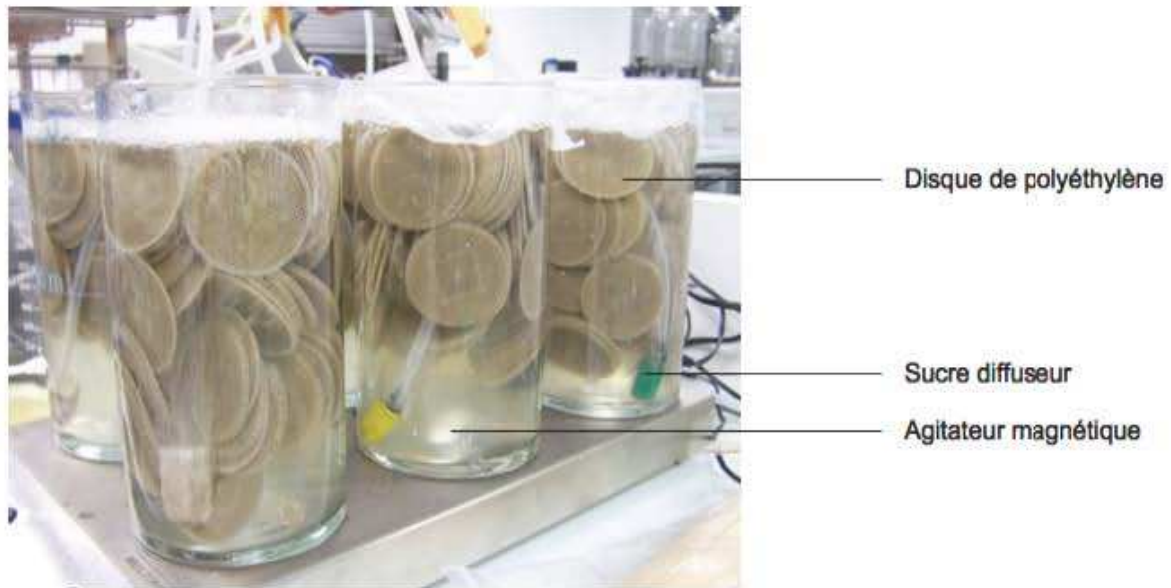


Figure 14 : Microcosmes procédé Kaldnes®.

3. Microcosmes de boues anaérobies

Les réacteurs ont consisté en des flacons sérum de 500 mL contenant 350 mL de boues, fermés hermétiquement et sertis d'une bague à vis. Ces flacons ont été incubés à 35°C en bain-marie. Les microcosmes étant fermés sans possibilité d'être ensuite ré-ouverts pour être alimentés en matière organique, l'apport d'éléments nutritifs a été réalisé une seule fois au début d'expérimentation. Cet apport a consisté en un mélange composé à 50% de boues issues du décanteur primaire et à 50 % de boues biologiques prélevées en sortie du décanteur secondaire (Figure 9). Ce mélange et les proportions apportées étaient alors considérés comme représentatifs de la fraction de boues arrivant dans le digesteur pendant une durée de 10 jours.

Des réacteurs témoins réalisés à partir de boues biologiques décantées ont également été réalisés en parallèle. Ces réacteurs ont consisté en un mélange composé à 50% de boues biologiques prélevées en sortie de décanteur secondaire et à 50% du mélange de boues constituant l'amendement. Les mélanges ont ensuite été bullés pendant 7 minutes à l'azote afin de créer des conditions d'anaérobies avant fermeture des flacons et incubation.

4. Microcosmes de sédiments de rivière

Les microcosmes de sédiments de rivière ont été réalisés comme les microcosmes de boues biologiques avec ou sans aération. Les sédiments ont été préalablement mixés au mixeur puis répartis en flacons Schott (pour les microcosmes aérés) ou les erlenmeyers (pour les microcosmes non aérés) en respectant un rapport d'un tiers de sédiments pour deux tiers d'eau

de rivière (Figure 15). Contrairement aux microcosmes de boues biologiques, les systèmes oxygénés n'ont pas été brassés de manière à rester représentatif de ce qui se passe dans l'environnement. Pour les microcosmes aérés, une aération de la colonne d'eau a été maintenue par de l'air compressé, préalablement barbotée dans de l'eau milliQ et filtrée sur membrane stérile de 0,22 μm de porosité. Enfin, l'apport de matière organique sous forme de bouillon nutritif a été adapté à l'échantillon. Partant du principe que la matière organique est apportée par le flux d'eau dans la rivière, la DCO de l'eau de rivière a été déterminée et un volume de bouillon nutritif correspondant à cette DCO a été apporté dans les microcosmes chaque jour.



Microcosmes de sédiments brassés - oxygénés



Microcosmes de sédiments non brassés - non oxygénés

Figure 15 : Microcosmes de sédiments de rivière.

5. Inoculation des microcosmes

Les réacteurs ont été inoculés avec le plasmide pB10 apporté par l'intermédiaire de la bactérie donneuse *Escherichia coli* DH5 α /pB10 (Schlüter *et al.*, 2003) ou sous forme d'ADN nu (contrôle). Les bactéries donneuses ont été préalablement cultivées en milieu LB supplémenté avec de la tétracycline (10 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) sous agitation à 160 rpm pendant 16h à 30 °C. Les bactéries ont ensuite été collectées par centrifugation à 8000 g pendant 2 min à température ambiante. Le culot bactérien a été lavé une fois avec un volume de 100 μL de MgSO_4 10 mM et la suspension bactérienne a été centrifugée une seconde fois dans les mêmes conditions. Le culot a alors été remis en suspension dans une solution de MgSO_4 10 mM de façon à obtenir une densité optique de 0,8 à $\lambda=600$ nm. Cette suspension a ensuite été utilisée pour inoculer les microcosmes de manière à apporter des concentrations variant de $2,96.10^5$ à $2,1.10^9$ UFC/mL selon les cas. Toutes les inoculations ont été réalisées après que les microcosmes aient été maintenus une heure dans les conditions fixées par l'expérience. Les réacteurs de boues anaérobies ont cependant fait exception, avec un ensemencement des boues avant le sertissage des flacons. Une partie des microcosmes a été inoculée avec de l'ADN nu de pB10. L'ADN plasmidique a été extrait à partir de cultures de DH5 α /pB10 à l'aide du kit d'extraction d'ADN plasmidique (Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA purification System, Promega), et directement inoculés au microcosmes à des concentrations initiales fixées par l'expérience.

6. Prélèvements et conditionnement des échantillons en microcosmes

Les microcosmes de boues biologiques et de sédiments de rivières ont été échantillonnés de manière similaire à concurrence de 50 mL par prélèvement. De par leur aspect homogène, les microcosmes de boues aérées - brassées ont pu être échantillonnés directement dans la colonne de boues à l'aide d'une pipette stérile. En revanche, les microcosmes de boues non aérés - non brassés et les microcosmes de sédiments ont dû être agités avant et/ou pendant le prélèvement pour garantir l'homogénéité de l'échantillonnage. Pour l'ensemble des microcosmes, le premier prélèvement a été réalisé 5 minutes après inoculation suivi d'autres prélèvements toutes les 24 heures. Le pH et la concentration en oxygène dissous de chaque échantillon ont été mesurés systématiquement afin de vérifier que les microcosmes avaient été maintenus avec un minimum de stabilité. Les prélèvements collectés ont tous été concentrés par centrifugation à 5000 rpm pendant 35 minutes et les surnageants ont été éliminés pour partie. Un volume de surnageant équivalent à celui du culot de boues ou de sédiments a été

utilisé pour remettre le culot correspondant en suspension afin de former une « liqueur ». Les liqueurs ont été congelées à -80 °C avant extraction d'ADN total.

Les microcosmes de boues anaérobies ont été échantillonnés par fractions de 20 mL, et conditionnés selon le protocole décrit pour les boues biologiques. Le premier prélèvement a été réalisé avant fermeture des flacons au moment du barbotage à l'azote. Les prélèvements suivants ont été effectués à l'aide de seringues stériles montées avec des aiguilles de 1 mm de diamètre. Toutes les 24 h, les flacons ont été dégazés à l'aide d'une microlance. La production de gaz a été estimée par pesées différentielles des flacons avant et après dégazage et a permis d'estimer l'activité biologique des boues afin d'en vérifier sa constance sur la durée de l'expérience en microcosmes.

Dans le cas des microcosmes de boues sur lit mobile (procédé Kaldnes), les prélèvements ont consisté à collecter 8 disques de polyéthylène immergés dans 25 mL de surnageant. L'ensemble a été congelé à - 20 °C pendant 24h. Après décongélation, les disques ont été broyés et la biomasse remise en suspension dans le surnageant à l'aide d'un mixeur (Waring, blender B010). L'extrait a ensuite été concentré par centrifugation et le culot microbien remis en suspension dans un volume équivalent de surnageant avant d'être congelé à - 80 °C comme précédemment.

IV. Extraction et purification de l'ADN total

1. Techniques d'extraction et de purification sélectionnées

Dix protocoles ont été testés et sont détaillés en annexe 1. Le protocole adapté de Porteous *et al.* détaillé est le suivant : 500 mg de l'échantillon testé sont mélangés avec 925 µL de tampon de lyse SDS (chlorure de sodium (NaCl) 0,25 M, acide éthylènediaminetétracétique disodique (Na₂EDTA) 0,1 M, sodium dodécyl sulfate (SDS) 4%) et 75 µL de guanidine isothiocyanate 4 M. Les échantillons sont homogénéisés à l'aide d'un vortex pendant 1 minute, soniqués à 180W pendant 2 min dans un bain à ultrasons (Transsonic Digital) et incubés pendant 90 minutes à 68°C. L'extrait est ensuite centrifugé à 13000 × g pendant 15 min à 4°C et 600 µL de surnageant sont récupérés. L'échantillon est précipité par ajout de 75µL d'acétate de potassium 5 M et 250 µL de polyéthylène glycol 8000 50% au surnageant. Le mélange est homogénéisé par retournements et précipité par incubation pendant 1h à -20°C. Le précipité est culoté par centrifugation à 13000 × g pendant 15 min à 4°C. Le culot est suspendu dans 900 µL de 2 × CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide 2%, NaCl 1,4 M, Na₂EDTA 0,1 M), soniqué 1 min à 180 W et incubé 15 min à 68°C. Un volume de 900 µL de

chloroforme est ajouté et l'échantillon est mélangé par retournements. La phase aqueuse est séparée par centrifugation à $13000 \times g$ pendant 10 min à température ambiante. L'ADN est précipité pendant 25 minutes à -20°C après ajout d'1 mL d'isopropanol. L'ADN est concentré par centrifugation à $13000 \times g$ pendant 15 min à 4°C . Le culot d'ADN est dissous dans 450 μL d'acétate d'ammonium 2,5 M et précipité par ajout de 1 mL d'éthanol 95% et incubation 25 min à -20°C . L'ADN est culoté par centrifugation à $13000 \times g$ pendant 15 min à 4°C puis suspendu dans 450 μL de tampon TAE 1 $\times$ (Tris acétate 0,04 M (pH 8,0), Na_2EDTA 0,001 M). Les impuretés résiduelles sont éliminées par filtration sur colonne de microconcentration Microcon-100 (Amicon, Beverly, Massachusetts, USA) par deux lavages successifs avec 450 μL de tampon TAE 1 $\times$ et un lavage avec 450 μL de tampon TE 1 $\times$ (Tris HCl 0,01 M (pH 8,0), Na_2EDTA 0,001 M). La colonne est inversée et l'ADN est élué avec 100 μL de tampon TE 1 $\times$ par centrifugation à $500 \times g$ pendant 5 minutes à température ambiante.

2. Evaluation de la concentration et de la pureté des ADN extraits

La concentration en ADN dans les échantillons et leur pureté ont été déterminées par spectrophotométrie UV (spectrophotomètre Eppendorf BioPhotometer 6131). La concentration en ADN est estimée par mesure à 260 nm où une unité d'absorbance en UV correspond à $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ d'ADN double brin.

La présence d'éventuelles contaminations a été évaluée par des mesures à 230 nm qui permettent d'estimer la présence de produits de dégradation des protéines (peptides), hydrates de carbone, substances humiques, molécules aromatiques (ex : phénol souvent utilisé en technique classique d'extraction) de sels et la persistance d'éthanol. Le rapport A_{260} / A_{230} doit être environ égal à 2 pour relater un bon niveau de pureté. Plus ce rapport est bas, plus la présence de contaminants, notamment les substances humiques, est avérée en des concentrations élevées dans les échantillons. L'absorbance à 280 nm permet d'estimer une contamination en protéines. Le rapport A_{260} / A_{280} doit être compris entre 1,8 et 2. Un rapport inférieur à 1,8 est le signe d'une contamination par les protéines. Un rapport supérieur à 2 est le signe d'une contamination par des ARN.

3. Evaluation de la fragmentation des ADN extraits

Le niveau de dégradation des ADN extraits a été estimé par électrophorèse sur gel d'agarose (Agarose / TBE 0,8 %). L'aspect de la migration ADN, la taille des fragments observés et l'intensité obtenue après marquage au bromure d'éthidium ont permis de rendre compte de façon qualitative du degré de dégradation de l'ADN.

V. Biologie moléculaire

1. Extraction d'ADN

1.1. Extraction d'ADN chromosomique de culture bactérienne pure

La souche bactérienne a été cultivée en milieu LB liquide à 30°C pendant 16 heures sous agitation à 160 rpm. Après culture, les bactéries ont été concentrées par centrifugation et l'ADN chromosomique a été extrait à l'aide du kit « Bio-Rad Aquapure Genomic DNA isolation kit » selon le protocole défini par le fabricant. La concentration en ADN dans les échantillons a été déterminée par spectrophotométrie UV (spectrophotomètre Eppendorf BioPhotometer 6131). Le nombre de copies équivalent dans 1 µg d'ADN génomique équivaut à $2,1 \cdot 10^8$ copies de génome. Les détails des calculs sont présentés en Annexe 2.

1.2. Extraction d'ADN plasmidique de culture bactérienne pure

La souche bactérienne a été cultivée en milieu LB liquide à 30°C pendant 16 heures sous agitation à 160 rpm. Après culture, les bactéries ont été concentrées par centrifugation et l'ADN plasmidique a été extrait à l'aide du kit « Wizard® Plus SV Minprep DNA purification system » selon le protocole défini par le fabricant. La concentration en ADN dans les échantillons a été déterminée par spectrophotométrie UV (spectrophotomètre Eppendorf BioPhotometer 6131). Le nombre de copies équivalent dans 1 µg d'ADN génomique équivaut à $1,41 \cdot 10^{10}$ copies de génome. Les détails des calculs sont présentés en Annexe 3.

2. Digestions enzymatiques

L'ensemble des enzymes de restriction utilisées ont été manufacturées par Promega et les réactions de digestion ont été réalisées selon les protocoles définis par le fabricant. Lorsque ceci est nécessaire, la purification de l'ADN digéré est réalisée avec le kit QIAquick® PCR purification kit (QIAGEN) selon le protocole recommandé par le fabricant.

3. Conditions de PCR qualitative

L'absence de molécules inhibitrices dans les extraits d'ADN a été estimée par la capacité de l'ADN à être amplifié par PCR. Ce test PCR a été réalisé avec un couple d'amorces « universelles » conçu pour amplifier une région d'environ 1500 bases du gène de l'ARN 16S bactérien : amorces universelles 27F (5' –AGAGTTTGATCCTGGCTCAG– 3') et 1492R (5' –TACGGYTACCTTGTTACGACTT – 3') (où Y dans la séquence de l'amorce représente une variation de base possible C ou T) (Lane, 1991). Les réactions de PCR ont été réalisées

dans un volume final de 50 µL contenant 200 µM de chaque dNTP, 0,4 µM de chaque amorce, 2,5 unités d'ADN polymérase (New England Biolabs), 3 mM MgCl₂ et 1× de tampon de réaction. Les cycles de PCR ont consisté en une étape initiale de dénaturation de 1 min à 94°C, suivi de 30 cycles d'amplification (94°C pendant 1 min, 60°C pendant 1 min, 72°C pendant 1min30) et d'une étape finale de 7 min à 72°C. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% en tampon TAE.

4. Conditions de PCR quantitative

La quantification de pB10 et DH5α par q-PCR a été réalisée avec la technologie Applied Biosystem. Les milieux réactionnels ont été élaborés à partir d'un kit PCR "TaqMan® Universal PCR Master Mix, NoAmpErase® UNG" (Applied Biosystems) dans les conditions recommandées par le fabricant, avec 800 nM de chaque amorces, et 300 nM des sondes TaqMan dans un volume réactionnel final ajusté à 50 µL avec l'eau PCR ADN/ARN free (Applied biosystems). Les réactions de q-PCR ont été réalisées avec un thermocycleur ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) sur microplaques de 96 puits (Applied biosystmes). Les cycles de PCR sont les suivants: un cycle de 10 min à 95°C suivi de 45 cycles de 30 s à 95°C et 1 min à 60°C pour les essais d'optimisation et : un cycle de 10 min à 95°C suivi de 45 cycles de 15 s à 95°C et 1 min à 60°C pour les analyses des ADN extraits des différents microcosmes.

5. Développement d'amorces et de sondes spécifiques pour DH5α et pB10

5.1. Recherche de séquences spécifiques par analyse en BLAST

La recherche de zones spécifiques sur la séquence de pB10 et DH5α a été réalisée par l'étude de la séquence ADN du plasmide pB10 disponible sur les bases de données nucléotidiques de NCBI sous le numéro [NC_004840](#). L'analyse des homologies a été faite par comparaison de cette séquence aux bases de données nucléotidiques « nr/nt » (nucleotides collections) à l'aide du logiciel en ligne blastn («Basic Local Alignment Search Tool», NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ ; Altschul *et al.*, 1997).

La même recherche a été effectuée pour DH5α à partir de la souche bactérienne *Escherichia coli* sp. K-12 subsp. MG1655 disponible sur les bases de données NCBI sous le numéro GenBank: U00096.2. La séquence génomique de DH5α a été reconstituée à partir de l'étude des travaux de Peters *et al.*, (2002) sur la séquence ADN de *E.coli* MC4100 dont le génome est proche de celui de DH5α.

5.2. Élaboration d'amorces et de sondes par bioinformatique

Les amorces et les sondes FAM - TAMRA spécifiques de pB10 et DH5 α ont été élaborées avec le logiciel Primer Express v2.0 (Applied Biosystems). Les couples ont été sélectionnés manuellement par localisation sur la séquence et selon leur capacité à répondre aux caractéristiques optimales des sondes et amorces définis par le cahier des charges Applied Biosystem.

Les sondes ADN correspondant à chaque couple ont été élaborées grâce au logiciel primer express (Applied biosystems). Une sélection des sondes a ensuite été réalisée selon différents critères :

- Pourcentage en bases G et C compris entre 20 et 80%
- Pas de base G à l'extrémité 5' de la sonde
- Sélectionner la sonde contenant le plus de bases G et C
- Température de fusion comprise entre 68 et 70°C
- Taille la plus petite possible mais supérieure à 15 nucléotides

Une sélection finale de couples d'amorces à été réalisée par simulation de PCR à l'aide du logiciel amplify 3.0 (© Bill Engels, 2005, University of Wisconsin). Les amorces et les sondes FAM/TAMRA (Tableau VII et VIII) ont été respectivement synthétisées par Eurogentec et Applied Biosystems.

Tableau VII : Sondes et amorces utilisées pour la détection de pB10 par q-PCR

Amorces ou sondes	Séquence nucléotidique	Cible	Taille de l'amplicon (en paires de bases)
Amorces			
Tn1	Tn1-in 5'-CAATACCGAAGAAAGCATGCG-3' Tn1-out 5'-AGATATGGGTATAGAACAGCCGTC-3'	<i>tnpA</i> de l'IS1071	135
Gfp1	Gfp1-in 5'-ATGGCCCTGTCCTTTTACC-3' Gfp1-out 5'-CTTTTCGTTGGGATCTTTTCG-3'	<i>gfpmut3*</i>	74
Gfp2	Gfp2-in 5'-GATGGCCCTGTCCTTTTACC-3' Gfp2-out 5'-CTTTTCGTTGGGATCTTTTCG-3'	<i>gfpmut3*</i>	75
Gfp3	Gfp3-in 5'-TGGCCCTGTCCTTTTACCAG-3' Gfp3-out 5'-TCTTTTCGTTGGGATCTTTTCG-3'	<i>gfpmut3*</i>	75
Sondes			
Tn1	(FAM)5'-CCTCCACGGTGCGCGCTG-3'(TAMRA)	<i>tnpA</i> de l'IS1071	
Gfp1	(FAM)5'-CCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCT-3'(TAMRA)	<i>gfpmut3*</i>	
Gfp2	(FAM)5'-ACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCT-3'(TAMRA)	<i>gfpmut3*</i>	
Gfp3	(FAM)5'-ACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCT-3'(TAMRA)	<i>gfpmut3*</i>	

Remarque : Les sondes Gfp1, 2, et 3 sont interchangeables entre les trois couples d'amorces Gfp 1, 2 et 3.

Tableau VIII: Sonde et amorces utilisées pour la détection de DH5 α par q-PCR

Amorces ou sondes	Séquence nucléotidique	Cible	Taille de l'amplicon (en paires de bases)
Amorces			
DH5-in	5'-ACCGGGTACATCATTTC-3	<i>mmuP</i> de K12	140
DH5-out	5'-GCCCCGGTAAGAATGAT-3'	<i>mhpD</i> de K12	
Sonde			
Tn1	(FAM)5'-CCTCCACGGTGC GCGCTG-3'(TAMRA)	Délétion U169	

5.3. Gamme étalon, contrôles négatifs et contrôles d'inhibition

Des gammes étalons de 7 (10^6 à 1 copies) et 5 points (10^6 à 10^2 copies) pour pB10 et DH5 α respectivement ont été réalisées à partir d'ADN pur plasmidique et d'ADN chromosomique. L'ADN plasmidique a été digéré par *Bam*HI (un seul site de coupure sur le plasmide) afin de linéariser l'ADN plasmidique et améliorer la détection. Une gamme étalon est réalisée pour chaque PCR et chaque point de gamme est réalisé en triplicat.

Deux témoins négatifs sont systématiquement réalisés pour chaque PCR et consistent en un ajout d'eau ultrapure à la place d'ADN matrice. Les contrôles d'inhibitions ont été réalisés au hasard sur deux échantillons à chaque plaque de PCR réalisée. Ils consistent à ajouter une concentration connue d'ADN de pB10 ou de DH5 α et vérifier ensuite que la concentration d'ADN cible détectée en PCR correspond.

Partie III : Résultats et discussion

Chapitre I. Suivi de transfert de pB10 par microscopie à épifluorescence

I. Choix du plasmide pB10 comme modèle d'étude

Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier l'influence de paramètres environnementaux sur la stabilité et le transfert d'un plasmide modèle. Le choix de ce plasmide a fait l'objet d'une étude bibliographique préalable afin de sélectionner le plus en adéquation possible avec le sujet de cette étude. Pour cela, différents critères ont été retenus. Tout d'abord, le plasmide sélectionné devait porter des gènes de résistance à des antibiotiques couramment utilisés en médecine humaine et détectés en STEP. Ensuite il devait avoir été isolé de bactéries environnementales sans avoir subi de modification génétique. Par ailleurs, il devait s'agir d'un plasmide capable de transfert par conjugaison et si possible, à des fréquences de transfert relativement élevées. Enfin, il devait présenter un large spectre d'hôte afin de pouvoir se transférer vers un grand nombre d'espèces bactériennes pour éventuellement pouvoir envahir les populations bactériennes indigènes de boues de STEP. L'analyse bibliographique effectuée dans ce but a permis de retenir différents plasmides dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau IX. Le plasmide pB10 a finalement été retenu pour la suite de ce travail. Il s'agit d'un plasmide de 64,508 kilobases isolé à partir de boues de STEP (Dröge *et al.*, 2000). Il appartient à la famille des plasmides IncP β qui sont ubiquitaires et qui ont été fréquemment identifiés comme des acteurs importants dans l'émergence et la dissémination de gènes de résistance en particulier chez les bactéries Gram négatives (Heuer *et al.*, 2002 ; Smalla et Sobecky, 2002 ; Van Overbeek *et al.*, 2002). Le plasmide conjugatif pB10 présente une fréquence de transfert importante (Schlüter *et al.*, 2003). La structure génétique de ce plasmide est détaillée sur la figure 16. Le plasmide pB10 consiste en une ossature classique d' IncP β à laquelle s'ajoute 4 transposons, tous plus ou moins tronqués (Tn501-like, Tn5393c, Tn1721-like, IS1071) et 1 intégron. Le transposon Tn501-like contient un gène codant une résistance au mercure. Tn5393c contient des gènes codant pour une résistance à la streptomycine. La version tronquée de Tn1721-like exprime une résistance à la tétracycline. L'intégron de classe I contenu dans le plasmide possède des gènes codant pour des résistances à l'amoxicilline (environ 38 % de la consommation française en antibiotique) et aux sulfonamides dont le sulfaméthoxazole (moins prescrit, environ 2,5 % des prescription en France en 2005, mais persistant en STEP).

Enfin, comme mentionné auparavant le plasmide pB10 devait présenter une fréquence de transfert relativement élevée afin de faciliter sa détection dans la suite de cette étude. D'après Dröge *et al.* (2000) pB10 est l'un des IncP β de la série des pB isolés de STEP qui se transfère le mieux avec des fréquences de transferts variant de $1,4 \cdot 10^{-1}$ à $3,8 \cdot 10^{-1}$ (plasmide transféré par bactérie receveuse) selon les bactéries donneuses et receveuses utilisées dans des expériences de conjugaison entre souches pures sur milieu gélosé.

Tableau IX : Plasmides sélectionnés par étude bibliographique et répondant aux critères de sélection pour l'étude

Plasmide	Famille	Taille (Kb)	Isolé de	Spectre d'hôte	Résistances antibiotiques exprimées	Transposons	Intégrons	Fréquence de transfert	Références
pB2	IncPβ	61	STEP	Large	Amp, Cm, Str, Sul, Tet	4	1	faible	Heuer <i>et al.</i> , 2004
pB3	IncPβ	56	STEP	Large	Amp, Cm, Str, Sul, Tet	4	1	faible	Tauch <i>et al.</i> , 2003
pB4	IncPβ	79	STEP	Large	Amx, Ery, Rox, Str	3	1	faible	Schlüter <i>et al.</i> , 2005
pB8	IncPβ	57	STEP	Large	Amx, Sp, Str, Sul	1	1	-	Szczepanowski <i>et al.</i> , 2004(a)
pB10	IncPβ	65	STEP	Large	Amx, Str, Sul, Tet	4	1	haute	Shlüter <i>et al.</i> , 2003
pRE25	pAMβ1	50	<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram +	Azi, Clr, Cm, Cli, Ery, Km, Lm, Nm, Nour, Rox, Str, Tyl	0	1	-	Schwarz <i>et al.</i> , 2001
pRSB101	IncPβ	48	STEP	Large	Nal, Cp, Ery, Nor, Rox, Sp, Str, Sul, Tet, Tm	1	2	-	Szczepanowski <i>et al.</i> , 2004(b)
pRSB107	IncF	121	STEP	Large	Amp, Cm, Ery, Km, Nm, Pen G, Str, Sul, Tet, Tm	0	2	-	Szczepanowski <i>et al.</i> , 2005
RP4	IncPα	60	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Large	Amp, Km, Tet	0	1	-	Pansegau <i>et al.</i> , 1994

Abbréviations : Amx : Amoxicilline ; Azi : Azithromycine ; Cm : Chloramphénicol ; Cli : Clindamycine ; Clr : Clarithromycine ; Cp : Céphalosporine ; Km : Kanamycine ; Lm : Lincomycine ; Nal : Acide nalidixique ; Nm : Néomycine ; Nor : Norfloxacine ; Nour : Nourséothricine sulfate ; Pen G : Pénicilline G ; Rox : Roxithromycine ; Sp : Spectinomycine ; Str : Streptomycine ; Sulf : Sulfamides ; Tet : Tétracycline ; Tm : Triméthoprim ; Tyl : Tylosine

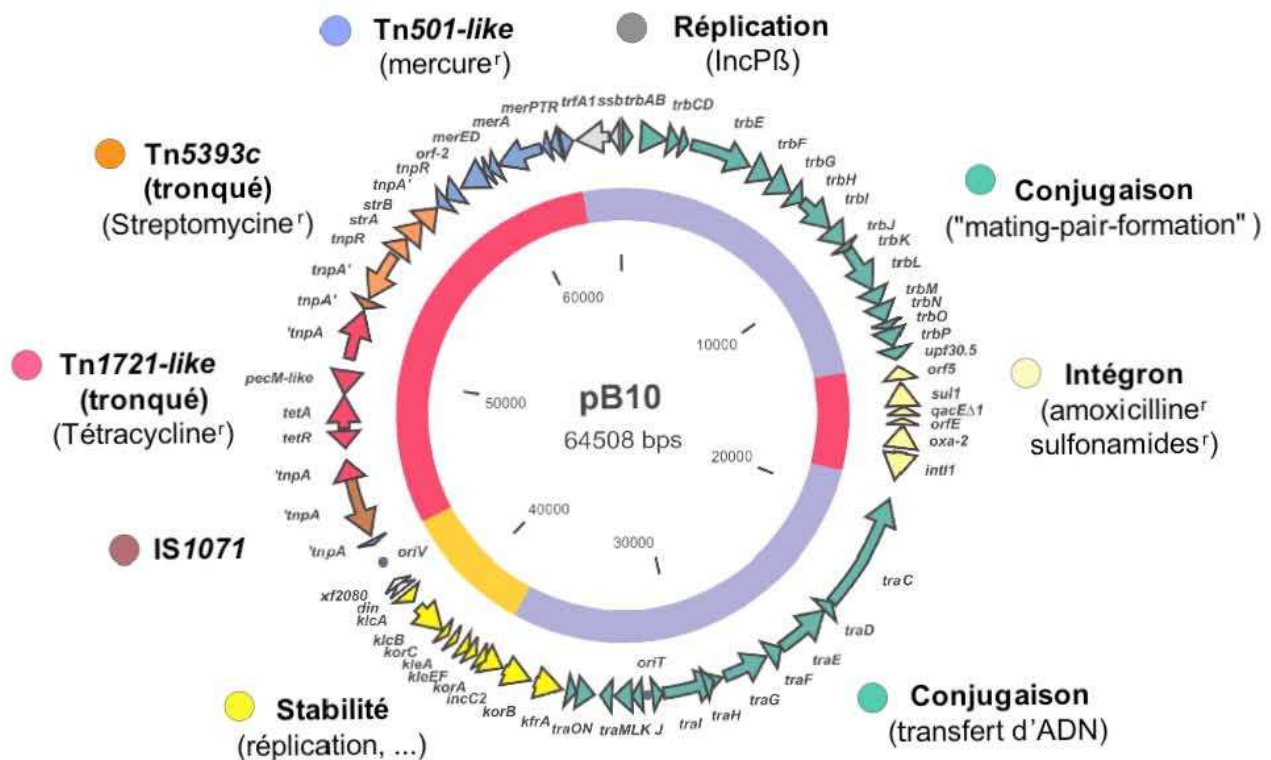


Figure 16 : Structure génétique du plasmide pB10 (d'après Schlüter *et al.*, 2003). Les gènes sont représentés par des flèches indiquant le sens de la transcription. Le code couleur utilisé identifie les gènes impliqués dans une même fonction ou structure. La structure du plasmide montre la présence de quatre transposons : « Tn501-like », Tn5393c, « Tn1721-like », IS1071 et d'un intégron. Le transposon de type Tn501 contient un gène codant une résistance au mercure. Le transposon Tn5393c contient des gènes codant pour une résistance à la streptomycine. Le transposon de type Tn1721 code pour une résistance à la tétracycline. L'intégron de classe I contenu dans le plasmide contient des gènes codant pour des résistances à l'amoxicilline et aux sulfonamides. Les fonctions de chaque gène, lorsqu'elles sont connues, sont décrites dans les bases de données (voir ACLAME par exemple : <http://aclame.ulb.ac.be/>).

L'efficacité de transfert de pB10 au laboratoire a été confirmée par Y. Bou Orom (LCPME, 2008) dans le cadre de ses travaux de Master grâce à des expériences de conjugaison sur filtre entre la souche donneuse d'*Escherichia coli* CM102, porteuse du plasmide pB10 (Tet^R), et la souche receveuse de *Cupriavidus metallidurans* CM49 (Rif^R). Ces expériences ont été réalisées sur différentes durées à deux températures (30 et 22°C). Après conjugaison, chaque type bactérien a été énuméré sur des milieux sélectifs appropriés : LB + tétracycline (20 µg/mL) pour sélectionner les bactéries donneuses (CM102) et transconjugantes (CM49/pB10) ; LB + rifampicine (100 µg/mL) pour sélectionner les bactéries receveuses (CM49) et transconjugantes (CM49/pB10) ; LB + tétracycline (20 µg/mL) + rifampicine (100 µg/mL) pour sélectionner les bactéries transconjugantes (CM49/pB10). Ces expériences de conjugaison ont montré qu'au bout de 24 heures de croisement, la fréquence de transfert de pB10 est relativement élevée avec 80 % de receveuses ayant reçu pB10. Les Figures 17 A et 17 B montrent l'évolution de la fréquence de transfert en fonction du temps et

de la température de croisement pour la conjugaison CM102 × CM49. Dès la première heure de la conjugaison, des fréquences de transfert non négligeables sont observées, et particulièrement à 30°C où elles atteignent $1,4 \times 10^{-3}$ transconjugants (CM49/pB10) par receveuse alors qu'elles ne sont que de 6×10^{-5} transconjugants par receveuse à 22°C. Cependant ces résultats montrent qu'à température ambiante le phénomène de conjugaison a lieu de façon rapide et visible, et que par conséquent des essais en microcosmes à 20°C sont réalisables.

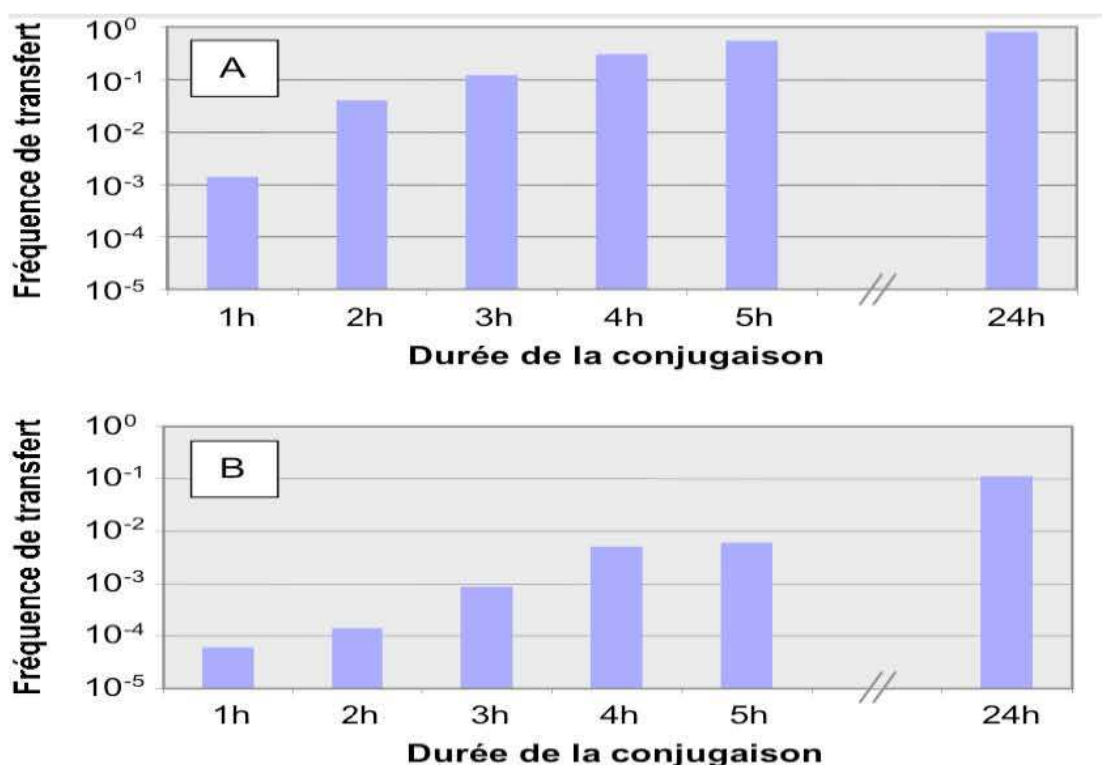


Figure 17 : Evolution de la fréquence de transfert de pB10 en fonction du temps de croisement à 30°C (A) et à 22°C (B) dans des conjugaisons *E. coli* CM102 × *C. metallidurans* CM49. La fréquence de transfert exprime le rapport entre le titre en bactéries cultivables transconjugantes CM49/pB10 et le titre en bactéries cultivables receveuses CM49, avec ou sans acquisition de pB10 (adapté de Y. Bou Orom, 2008).

II. Transfert de pB10 en boues de STEP : suivi par microscopie à épifluorescence

Dans un premier temps, nous avons envisagé de suivre le transfert de pB10 dans des communautés microbiennes naturelles en utilisant une approche développée dans les travaux de Geisenberger *et al.* (1999) dans lesquels le transfert du plasmide RP4 a été suivi *in situ* dans des boues activées (Figure 18). Dans ces travaux les auteurs ont utilisé un plasmide RP4 étiqueté avec une cassette contenant le gène de la GFP (green fluorescent protein) placé sous le contrôle du promoteur inductible *Plac*. En utilisant une bactérie donneuse génétiquement modifiée pour exprimer le répresseur LacI, le promoteur *Plac* reste inactif et la cellule donneuse ne produit pas de GFP. Lorsque le plasmide est

transféré vers une bactérie receveuse, l'absence de répresseur chez les bactéries receveuses permet l'expression du gène *gfp* et la bactérie émet une fluorescence détectable en microscopie à épifluorescence.

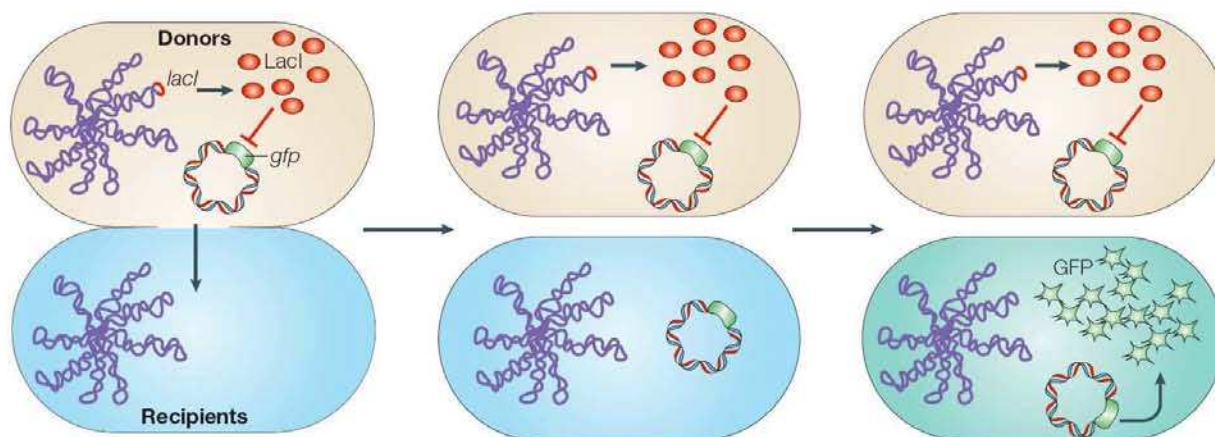


Figure 18 : Principe du transfert de plasmide suivi par épifluorescence selon Geisenberger *et al.*, 1999 (Illustration d'après Sorensen *et al.*, 2005). La méthode repose sur l'utilisation d'un plasmide étiqueté avec une cassette contenant le gène de la GFP (green fluorescent protein) placé sous le contrôle du promoteur P_{lac} . En utilisant une bactérie donneuse génétiquement modifiée pour exprimer le répresseur LacI, le promoteur P_{lac} reste inactif et la cellule ne produit pas de GFP ; lorsque le plasmide est transféré vers une bactérie receveuse, l'absence de répresseur permet l'expression du gène GFP et ainsi la bactérie receveuse ayant acquis le plasmide émet une fluorescence détectable.

Cette approche a été envisagée pour suivre le transfert de pB10 en boues. À cette fin, le plasmide pB10 a d'abord dû être modifié génétiquement pour exprimer une GFP sous contrôle d'un promoteur P_{lac} inductible.

1. Construction de plasmides pB10::mini-Tn5-*gfp*

La modification du plasmide pB10 a été réalisée par insertion d'un transposon mini-Tn5-*gfp* selon une stratégie proche de celle décrite par Christensen *et al.* (1998). Dans un premier temps une banque insertionnelle a été réalisée dans la souche CM124 de *C. metallidurans* (AE815/pB10). Le transposon mini-Tn5-*gfp* a été apporté CM124 au moyen du vecteur suicide pJBA28 porté par une bactérie *E. coli* JB120 (CM32). Les fonctions de répllication de pJBA28 sont codées par le chromosome de la souche donneuse JB120, alors que les fonctions de transfert du plasmide sont apportées en *trans* par une troisième souche, la souche auxiliaire HB101/pRK600 (CM30). Le transfert de pJBA28 vers la souche a donc été réalisé par un croisement triparental entre la souche donneuse JB120, la souche receveuse AE815/pB10 et la souche auxiliaire HB101/pRK600 (Figure 19). Le plasmide pJBA28 ne peut se répliquer en dehors de son hôte JB120 et il disparaît avec le mini-Tn5-*gfp*, à moins que ce dernier n'ait eu le temps de se transposer dans le transconjugant. La

banque insertionnelle ainsi générée a été obtenue en sélectionnant l'acquisition du transposon (résistance à la kanamycine) chez les bactéries receveuses (résistance à la rifampicine).

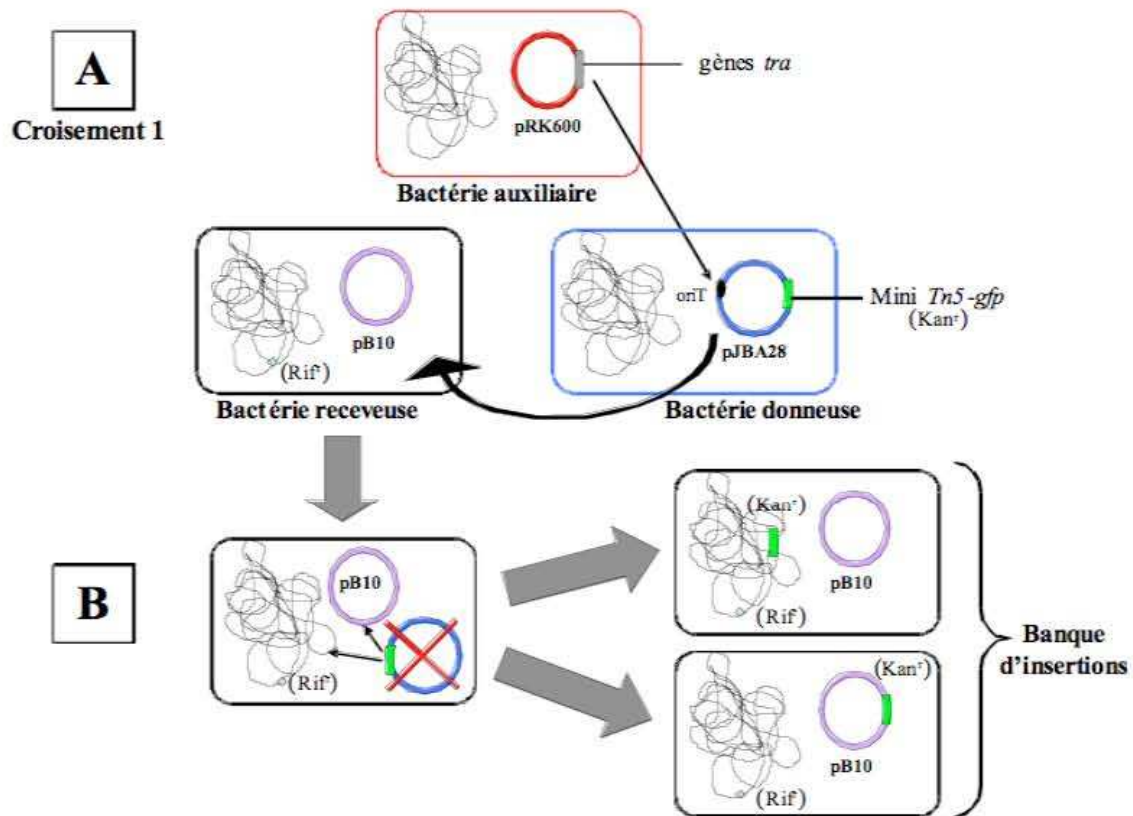


Figure 19 : Principe de la mutagenèse insertionnelle de pB10 par le transposon mini-Tn5-gfp

A : Le transposon mini-Tn5-gfp a été apporté à la souche porteuse du plasmide pB10 au moyen d'un vecteur suicide pJBA28. Les fonctions de répllication de pJBA28 sont codées par le chromosome de la souche donneuse (JB120) alors que les fonctions de transfert du plasmide sont apportées *in trans* par la souche auxiliaire HB101/pRK600. Le transfert de pJBA28 a été réalisé par un croisement triparental entre la souche donneuse JB120, la souche receveuse AE815/pB10 et la souche auxiliaire HB101/pRK600 ; **B :** Lorsque le plasmide pJBA28 est acquis par la bactérie receveuse, le mini-Tn5-gfp pourra se transposer dans le génome de l'hôte (pB10 ou chromosome) avant que le plasmide suicide ne disparaisse *Km^r* : résistance à la kanamycine ; *Rif^r* : résistance à la rifampicine.

La banque insertionnelle se compose d'insertions du transposon mini-Tn5-gfp se répartissant aléatoirement entre le génome de AE815 (composé de deux réplicons de à 3,93 et 2,58 Mb) et le plasmide pB10 (64 kb). En considérant le fait que pB10 ne représente que 0,98 % du génome total de la bactérie et sachant que 941 mutants insertionnels ont été isolés, 9 insertions différentes sont statistiquement attendues dans le plasmide pB10. Pour isoler ces mutants, une deuxième expérience de conjugaison a été nécessaire.

Les plasmides pB10 alourdis d'une insertion (pB10::mini-Tn5-*gfp*) ont été isolés en conjugant la banque avec une nouvelle bactérie receveuse (*E. coli* CM125, résistante à l'acide nalidixique), en sélectionnant des transconjugants pour l'acquisition du mini-Tn5-*gfp* (marqueur Km^r) (Figure 20). Seule une insertion sur pB10 rend le transposon mobile alors que les insertions sur le chromosome sont statiques. Une sélection antibiotique a donc été basée sur le transfert du mini-Tn5-*gfp* vers la souche receveuse *E. coli* CM125 (résistance à l'acide nalidixique) et a finalement permis d'isoler des transconjugants CM125/pB10::mini-Tn5-*gfp*.

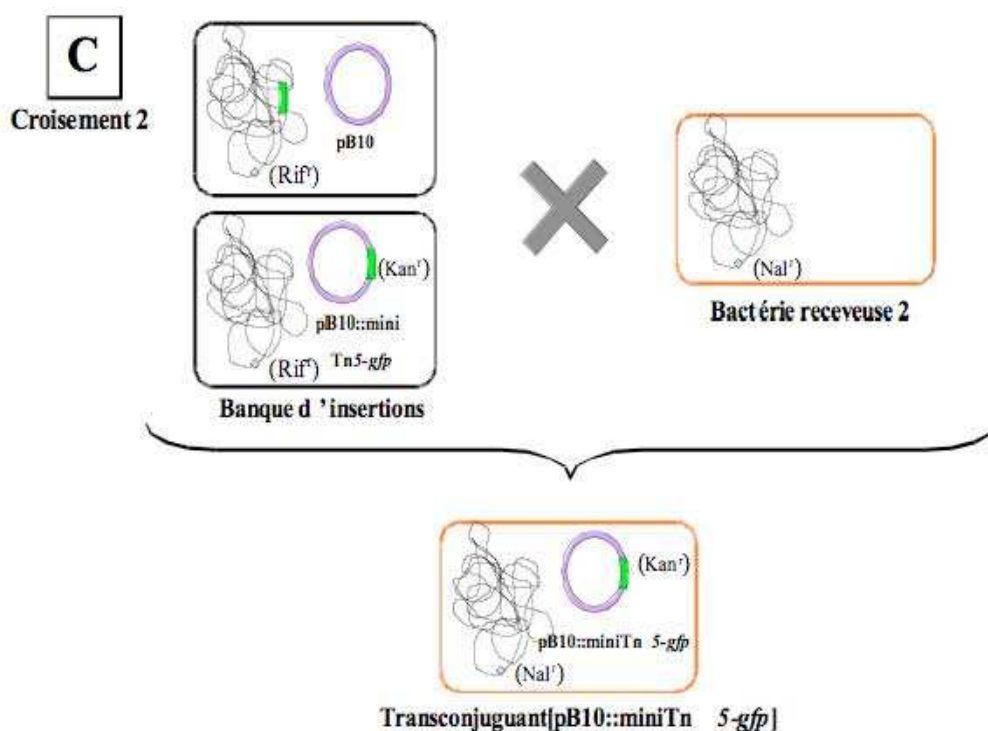


Figure 20 : Sélection des clones pB10::mini-Tn5-*gfp* dans la banque d'insertions par croisement biparental. C : Une deuxième conjugaison a été nécessaire pour isoler des insertions du transposon mini-Tn5-*gfp* survenues dans le plasmide pB10. Une sélection antibiotique basée sur le transfert du mini-Tn5-*gfp* (résistance à la kanamycine) vers la souche receveuse CM125 (résistance à l'acide nalidixique) a finalement permis d'isoler des transconjugants CM125/pB10::mini-Tn5-*gfp*. Km^r : résistance à la kanamycine ; Nal^r : résistance à l'acide nalidixique ; Rif^r : résistance à la rifampicine.

2. Localisation des insertions du transposon mini-Tn5-*gfp* sur la structure de pB10 dans les différents clones isolés

Vingt clones choisis au hasard sur 200 clones ont été purifiés et leur contenu en plasmide extrait puis analysé par digestion avec des enzymes de restriction. Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et les profils de restriction interprétés afin de localiser les

insertions du mini-Tn5-*gfp* sur la séquence de pB10. Un exemple de profils de restriction obtenu par digestion des clones avec *SalI* est présenté sur la figure 21.



Figure 21 : Profils de restriction des clones pB10::mini-Tn5-*gfp* digérés par *SalI* (piste 1 : plasmide pJBA28 digéré par *SalI* ; piste 2 : plasmide pB10 sauvage digéré par *SalI* ; pistes 3 à 22 : plasmides pB10::mini-Tn5-*gfp* extraits des clones isolés digérés par *SalI*).

Leurs profils de restriction montrent que tous les ADN digérés correspondent au plasmide pB10 alourdi d'une insertion correspondant au mini-Tn5-*gfp*. Sur vingt clones analysés, sept insertions différentes ont été caractérisées (Figure 21) et localisées sur le plasmide (Figure 22). 7 profils de restriction différents ont été obtenus (Figure 21) :

- profils 1 et 6 (pistes 3,6,20 et pistes 9,17,18) : les insertions sont situées dans la zone des gènes impliqués dans la stabilité du plasmide.
- profil 2 (pistes 4,13,14) : les insertions sont situées au niveau de l'intégron porté par pB10, en particulier dans la zone constituée des gènes *orfE* et *oxa-2*.
- profil 3 (piste 5) : l'insertion est localisée au niveau de la région proche de l'origine de répllication du plasmide (*oriV*).
- profil 4 (pistes 7,19) : les insertions sont localisées sur l'intégron de classe I.
- profils 5 et 7 (pistes 8,10,11,12 et pistes 21 et 22) : les insertions sont situées au niveau du gène tronqué *tnpA* codant la transposase de l'IS1071.

3.1. Transformation de différentes espèces bactériennes

Le plasmide pB10 doit être introduit dans une communauté microbienne par l'intermédiaire d'une bactérie donneuse. Le choix de la bactérie donneuse utilisée peut avoir une profonde incidence sur le spectre d'espèces des transconjugants dans une communauté bactérienne (De Gelder *et al.*, 2005). Dans ce but, différentes espèces bactériennes ont été transformées avec les clones pB10::mini-Tn5-*gfp*, de manière à disposer d'un panel de souches destinées à servir de bactéries donneuses :

- *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (CM150)
- *Pseudomonas putida* SM1443 (CM118)
- *Ralstonia eutropha* dérivée de JMP228 (CM121)
- *Sinorhizobium meliloti* dérivée de RM1021 (CM122)
- *Escherichia coli* (CM125)

Préalablement, le gène *lacI^q* (qui réprime l'expression du gène *gfp* porté par pB10) a été inséré dans le chromosome des bactéries donneuses qui ne le possédaient pas. Cette insertion chromosomique a été réalisée par croisement triparental comme décrit par De Gelder *et al.* (2005). Le transposon portant le gène *lacI^q* a été apporté à la souche donneuse au moyen d'un vecteur plasmidique suicide pSM1435. Les fonctions de répllication de pSM1435 sont codées par le chromosome de la souche donneuse (CC118(λ pir)/pSM1435) alors que les fonctions de transfert du plasmide sont apportées en *trans* par la souche auxiliaire HB101/pRK600. Le transfert de pSM1435 a été réalisé par un croisement triparental entre la souche donneuse CC118(λ pir)/pSM1435, la souche receveuse et la souche auxiliaire HB101/pRK600.

Ces différentes espèces ont été utilisées pour étudier ensuite l'incidence des insertions sur la physiologie de la cellule et les propriétés du plasmide pB10 natif comme le spectre de résistance aux antibiotiques.

3.2. Effet de l'insertion sur les profils de résistance antibiotique du plasmide pB10

Les résistances aux antibiotiques codées par pB10 ont été testées chez *E. coli* CM125 porteuse des différents clones pB10::mini-Tn5-*gfp* et chez les différentes souches listées dans le paragraphe 3.1. Les tests de croissance ont consisté à étaler les bactéries à différentes dilutions sur des milieux LB gélosés contenant des concentrations en antibiotiques définies. Les colonies formées ont été dénombrées et ces nombres ont été comparés à ceux obtenus pour des bactéries portant le plasmide pB10 natif. Les spectres antibiotiques établis pour les différents clones dans les différentes souches bactériennes montrent que, malgré les insertions, les résistances sont exprimées de la même façon que le plasmide pB10 natif pour la plupart des clones. D'une façon générale, des variations des

résistances sont observées pour un même antibiotique en fonction de l'hôte bactérien dans lequel les plasmides ont été insérés. Ces variations sont hôte-dépendantes et ne sont pas dues à la seule insertion du mini-Tn5-*gfp* sur pB10. Cependant, une diminution de la résistance à la tétracycline est observée pour les clones pB10::mini-Tn5-*gfp* 5, 6 et 7 lorsqu'ils sont insérés dans *Escherichia coli* CM125. Les colonies observées sont de plus petite taille ce qui traduit une sensibilité plus importante à la tétracycline à la concentration de 100µg/mL (Tableau X). Par conséquent les clones 5, 6 et 7 n'ont pas été retenus pour l'étude.

Tableau X : Spectres de résistance aux antibiotiques conférés par les différents plasmides pB10::mini-Tn5-*gfp* dans *E.coli* Mg1655 (CM125)

Souche bactérienne	Amoxicilline		Streptomycine		Sulfaméthoxazole		Tétracycline	
	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
CM125	-	-	-	-	+	+/-	-	-
CM125/pB10 natif	+	+/-	+	+	++	++	++	++
CM125/pB10 ::mini-Tn5- <i>gfp</i> 1	+	+/-	++	+	++	++	++	++
CM125/pB10 ::mini-Tn5- <i>gfp</i> 2	+	+/-	++	+	++	++	++	++
CM125/pB10 ::mini-Tn5- <i>gfp</i> 3	+	+/-	++	+	++	++	++	++
CM125/pB10 ::mini-Tn5- <i>gfp</i> 4	+	+/-	++	+	++	++	++	++
CM125/pB10 ::mini-Tn5- <i>gfp</i> 5	+	+/-	++	+	++	++	++	+
CM125/pB10 ::mini-Tn5- <i>gfp</i> 6	+	+/-	++	+	++	++	++	+
CM125/pB10 ::mini-Tn5- <i>gfp</i> 7	+	+/-	++	+	++	++	++	+

++ : Bonne croissance (identique à la croissance contrôle de la souche sur milieu sans antibiotique) ; + : Croissance ralentie (colonies de plus petite taille) ; +/- : Croissance altérée (peu de colonies arrivent à se développer) ; - : Pas de croissance.

3.3. Impact des insertions sur la physiologie de la cellule hôte

L'impact global des différents clones pB10::mini-Tn5-*gfp* sur la physiologie des bactéries donneuses a été estimé par un suivi de croissance des bactéries. Pour cela des cinétiques de croissance ont été réalisées, en bouillon LB sous agitation (160 rpm) à 30°C, afin d'estimer le temps de génération de quatre bactéries hôtes différentes (*Escherichia coli* Mg1655 et JM109, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*) transformées avec pB10 (contrôle) ou avec chacun des clones pB10::mini-Tn5-*gfp* de type 1, 2 et 3. Aucune différence notable n'a été observée dans les cinétiques de croissance chez *Escherichia coli* MG1655 (CM125) et JM109 (CM155) (cf. temps de générations dans le tableau XI).

Tableau XI : Incidence de pB10 et des clones pB10-mini-Tn5-gpf sur le temps de génération des cellules hôtes

Souches bactérienne	Plasmide	Temps de génération (min)
<i>P. putida</i> CM118	-	38
	pB10	40
	pB10 ::mini-Tn5-gfp1	75
	pB10 ::mini-Tn5-gfp2	67
	pB10 ::mini-Tn5-gfp3	80
<i>E. coli</i> JM109 CM155	-	52
	pB10	42
	pB10 ::mini-Tn5-gfp1	42
	pB10 ::mini-Tn5-gfp2	41
	pB10 ::mini-Tn5-gfp3	43
<i>E. coli</i> MG1655 CM125	-	44
	pB10	45
	pB10 ::mini-Tn5-gfp1	47
	pB10 ::mini-Tn5-gfp2	48
	pB10 ::mini-Tn5-gfp3	47
<i>P. aeruginosa</i> CM150	-	36
	pB10	59
	pB10 ::mini-Tn5-gfp1	61
	pB10 ::mini-Tn5-gfp2	89
	pB10 ::mini-Tn5-gfp3	58

En revanche, il est tout de suite apparu que l'acquisition de n'importe lequel des trois plasmides mutagénisés freinait la croissance de *Pseudomonas putida* CM118 avec un temps de génération moyen passant de 38 à 67-80 minutes selon le clone considéré (Tableau XI). Les effets de la transformation de *P. putida* avec un plasmide pB10::mini-Tn5-gfp (type 1, 2 ou 3) ne se limite pas à un ralentissement de croissance mais s'accompagne également d'une période de latence considérablement accrue en début de croissance après inoculation (Figure 23). La croissance de CM118/pB10::mini-Tn5-gfp1 s'initie après 4 heures de culture alors que celles de CM118 et CM118/pB10 entre en phase exponentielle de croissance au bout d'une heure. Le même phénomène a été constaté lorsque la bactérie porte un plasmide pB10::mini-Tn5-gpf de type 2 ou 3. Les insertions du transposon pour ces 3 types de clones sont localisées à des endroits différents sur la structure du plasmide (gène *tnpA* de l'IS1071 (clones de type 1) ; niveau de l'intégron de classe I (clones de type 2) ; à proximité de l'*oriV* (clones de type 3)). Les insertions de type 1 et 3 sont proches, mais celles de type 2 sont localisées ailleurs sur la séquence de pB10. De ce fait, les altérations de croissance observées pour *P. putida* ne peuvent être attribuées qu'à la présence du mini-Tn5-gfp et non à son site d'insertion dans pB10. Il pourrait donc s'agir d'une toxicité due à l'accumulation d'un produit résultant de l'expression d'un des gènes du mini-Tn5 en l'occurrence la GFP. L'accumulation possible de la GFP dans les cellules au cours des 16 à 18 heures de

préculture pourrait avoir été toxique pour les cellules. La remise en culture aurait eu pour effet la dilution de cette GFP au fur et à mesure que les cellules se divisent jusqu'à un stade où la croissance peut reprendre normalement. Un phénomène similaire a été observé par H. Guilloteau et C. Merlin (Communication personnelle) avec une corrélation latence-accumulation de GFP vue par cytométrie en flux. Les travaux de Deschamps *et al.* (1995) ont d'ailleurs mis en évidence une possible toxicité de l'accumulation de GFP dans *E. coli* transformée avec un plasmide pTU58 portant un gène *gfp*. La croissance de la souche, portant un plasmide pTU58GFP, dans des conditions où l'expression du gène était induite, a montré un ralentissement de la croissance de la bactérie. Sans induction du gène, la croissance de la souche n'a pas été perturbée. L'analyse du contenu cellulaire en GFP a montré une forte accumulation de la protéine dans la souche cultivée en conditions où le gène *gfp* était induit et cette accumulation expliquerait donc l'effet toxique observé.

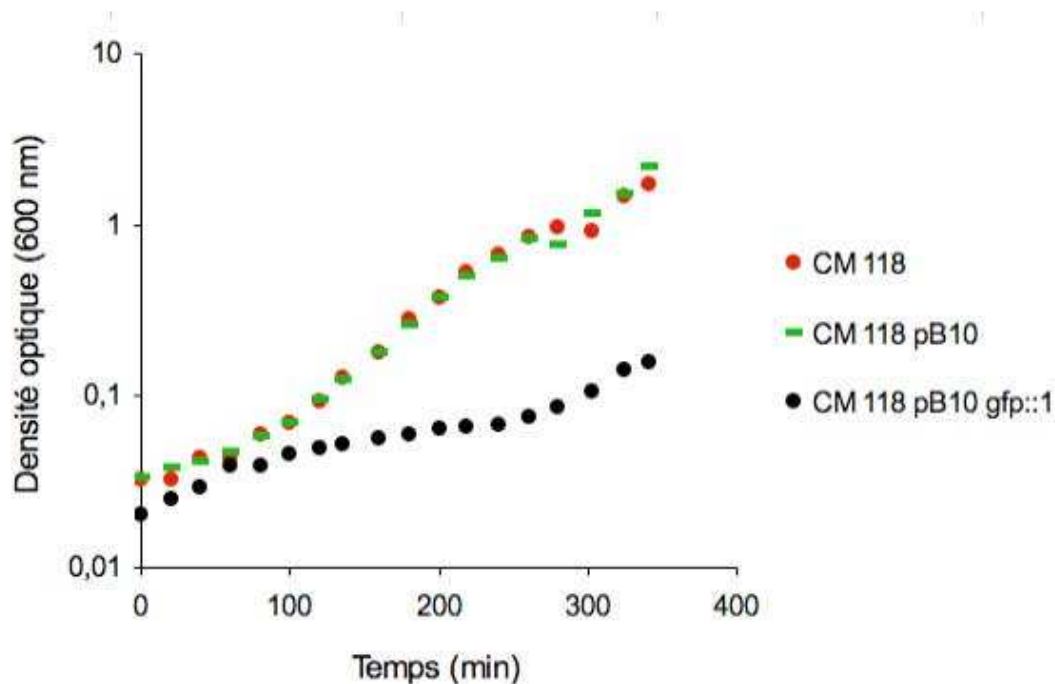


Figure 23 : Incidence de l'insertion du mini-Tn5-*gfp* sur la croissance de *Pseudomonas putida* : Cinétique de croissance de *Pseudomonas putida* transformée ou non par pB10 et le clone pB10::mini-tn5-*gfp*. Les cinétiques ont été réalisées en triplicat à partir de cultures différentes. Le phénomène observé est représentatif de celui constaté pour les clones de type 2 et 3. La bactérie transformée avec le clone pB10::mini-Tn5-*gfp*1 a une croissance ralentie par rapport à la bactérie native ou transformée avec le plasmide natif.

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la présence d'un plasmide pB10 modifié ou non, entraîne un ralentissement de la croissance qui se trouve divisée par deux. L'acquisition du plasmide est donc un fardeau énergétique pour la bactérie ralentissant sa croissance. Les travaux de Heuer *et al.* (2007) ont d'ailleurs mis en évidence le coût énergétique de pB10 dans *P. putida* H2 sp. (supérieur quand la bactérie porte le plasmide).

3.4. Inductibilité de la fluorescence codée par le plasmide pB10::*gfp*-1 chez *E. coli*

Parallèlement l'étude de l'inductibilité du gène *gfp* pour les clones pB10::mini-Tn5-*gfp*1, 2 et 3 a été réalisée. Le gène *gfp*, réprimé grâce au répresseur LacI dans différentes bactéries donneuses est artificiellement induit à l'aide d'isopropyl-béta-thio-galactoside (IPTG). Des observations par microscopie à épifluorescence ont permis de vérifier l'inductibilité du gène *gfp* et la stringence du système de répression *lacI* pour les différents plasmides pB10::mini-Tn5-*gfp*. Cette information constituera un critère de sélection important pour le choix du plasmide à utiliser.

Le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp*1 a été choisi pour évaluer l'inductibilité de la GFP lorsque le répresseur est inactivé dans la souche CM125 d'*E. coli* susceptible de servir de donneuse dans des expériences de transfert en boue. Pour se faire, la bactérie CM125/pB10::mini-Tn5-*gfp*1 (CM192) a été cultivée sur LB gélosé en présence et en absence d'IPTG à 400 μ M (isopropyl- β -D-thio-galactoside) et observée en microscopie à épifluorescence. L'IPTG est un analogue non métabolisable du lactose qui empêche la protéine LacI d'agir comme répresseur sur le promoteur P_{lac} et doit théoriquement induire l'expression de la GFP dans la construction génétique. Les résultats présentés en Figure 24 montrent que chez *E. coli* CM125/pB10::mini-Tn5-*gfp*1, l'expression du gène *gfp* est bien inductible par l'IPTG. Un niveau de base de fluorescence est observé même pour des cellules cultivées sans IPTG ce qui signifie que la bactérie donneuse est déjà légèrement fluorescente. La souche CM125/pB10::mini-Tn5-*gfp*1 ne peut donc pas servir de donneuse dans des expériences où le transfert du plasmide est suivi par microscopie à épifluorescence. Cette expérience montre que le système répresseur LacI ne réprime pas complètement l'expression du gène *gfp*, ce qui pourrait être dû à un phénomène de « fuite » au niveau de la répression exercée sur le promoteur P_{lac} . Une solution à ce problème pourrait consister à utiliser l'allèle *lacI^q* du gène qui conduit à une surproduction du répresseur et donc un meilleur contrôle de la répression au niveau du promoteur P_{lac} .

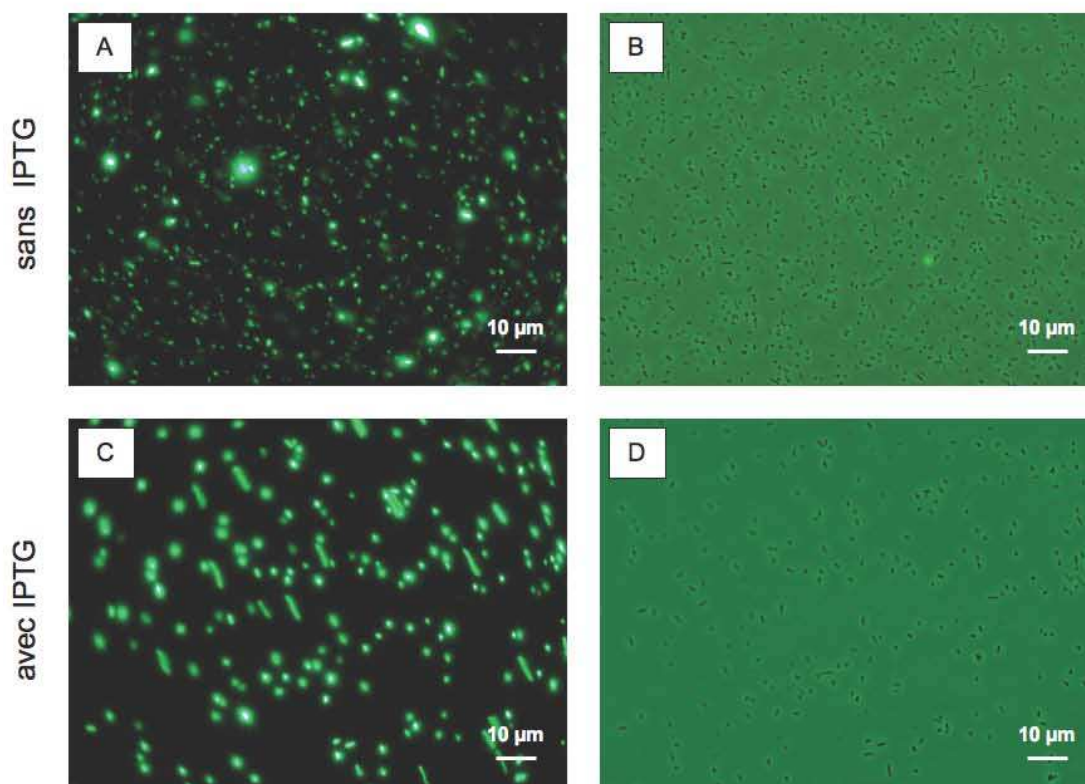


Figure 24 : Induction de la GFP chez *E. coli* (CM125/pB10::mini-Tn5-*gfp1*) en présence et en absence d'IPTG. Bactéries observées en microscopie à épifluorescence (A et C) et en contraste de phase (B et D) (résultats obtenus par Y. Bou Orom, Master, 2008).

3.5. Inductibilité de la fluorescence contrôlée par le variant *lacI^q*

Conformément au test précédent, 5 souches possédant à la fois l'allèle *lacI^q* et le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp* (*Pseudomonas putida* CM118, *Escherichia coli* CM155, *Pseudomonas aeruginosa* CM210 (CM150::*lacI^q*/pB10::mini-Tn5-*gfp*-1), *Sinorhizobium meliloti* CM217 (CM122/pB10::mini-Tn5-*gfp*1), *Cupriavidus necator* CM224 (CM121/pB10::mini-Tn5-*gfp*1)) ont été cultivées en présence et en absence d'IPTG puis observées en microscopie à épifluorescence. Comme attendu, en absence d'IPTG aucune fluorescence n'a été observée. Pour cette raison aucune photo n'est présentée ici. En revanche, la présence d'IPTG (40 µM) a parfaitement induit l'émission de fluorescence chez *E. coli* CM155 transformée par pB10::mini-Tn5-*gfp*1 (Figure 25 A). L'émission de fluorescence lorsque la bactérie est transformée par pB10::mini-Tn5-*gfp*2 ou 3 est moins marquée (Figure 25 C et 25 E). Les mêmes observations ont été constatées chez *P. putida* CM118 où l'émission de fluorescence est carrément indétectable lorsqu'elle est transformée par des clones pB10::mini-Tn5-*gpf*3 (Figure 26 A, 26 C et 26 E). Ceci montre donc que l'induction est variable d'un clone à l'autre et que le meilleur clone pB10::gpf pour notre étude est le clone pB10::mini-Tn5-*gfp*1.

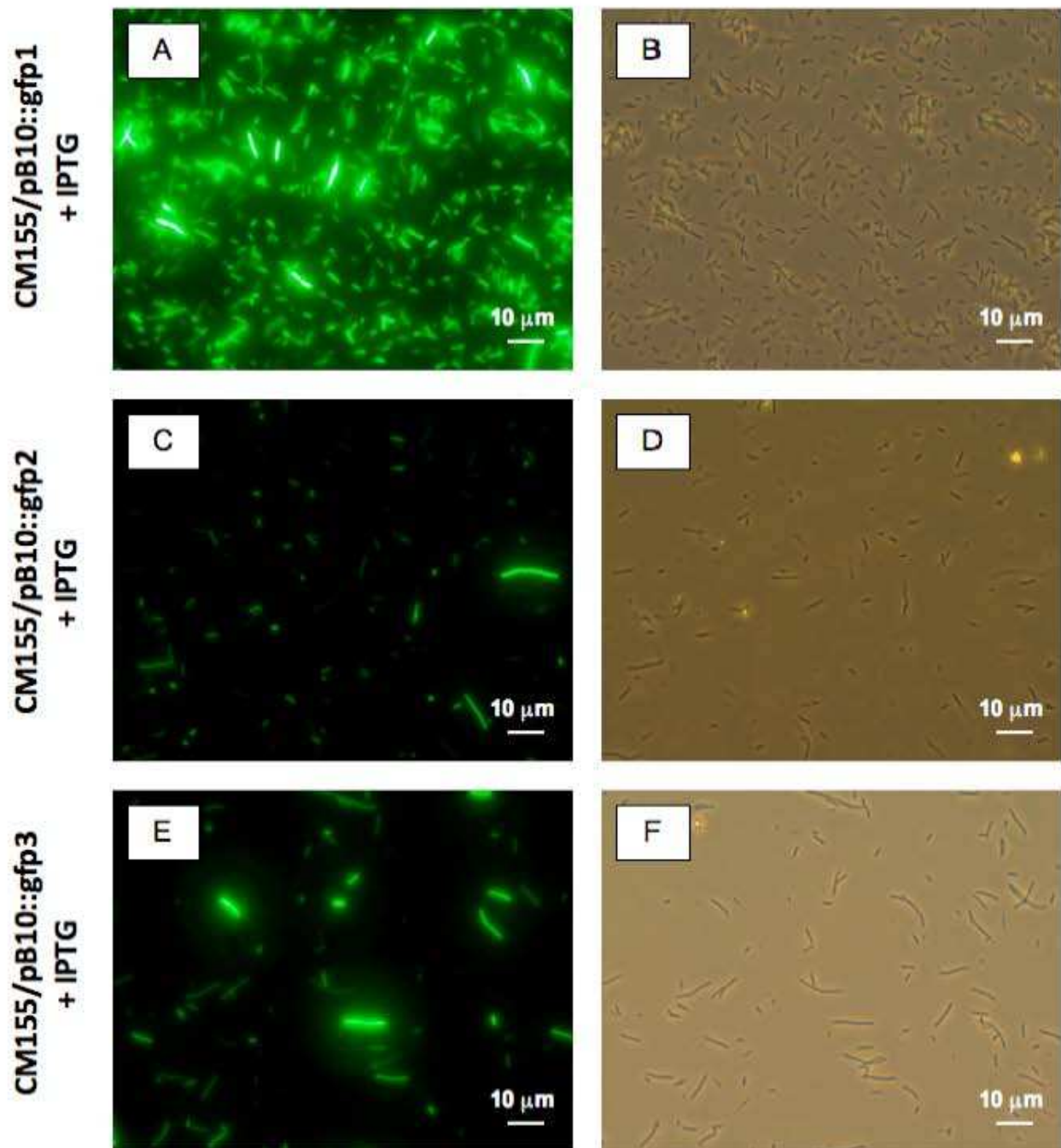


Figure 25 : Expression de la GFP chez *Echerischia coli* CM155/pB10::mini-Tn5-*gfp*1,2 et 3 en présence d'IPTG. Bactéries observées en microscopie à épifluorescence (A, C et E) et en contraste de phase (B, D et F). (× 1000).

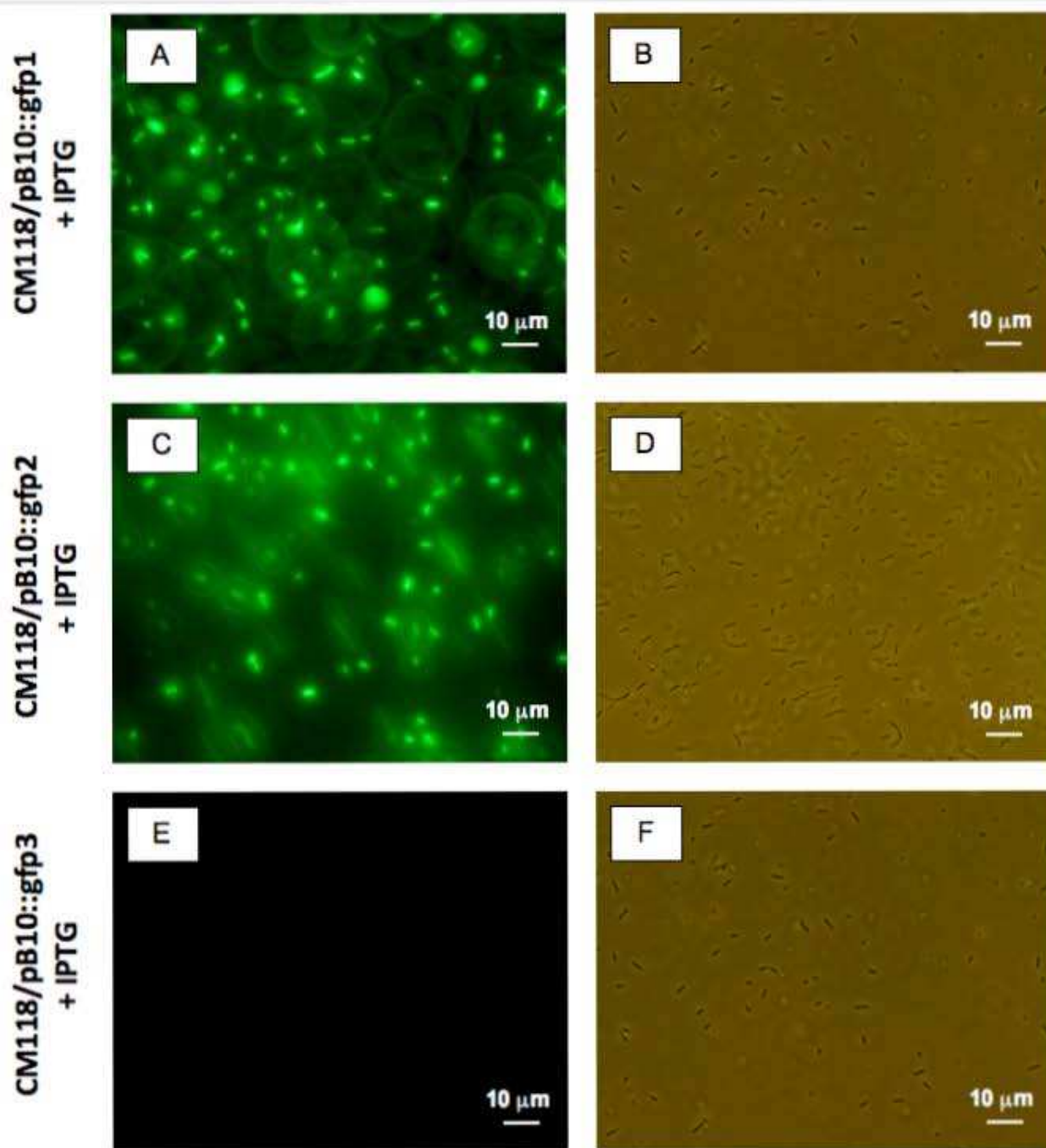


Figure 26 : Expression de la GFP chez *Pseudomonas putida* CM118/pB10::mini-Tn5-*gfp1*, CM118/pB10::mini-Tn5-*gfp2* et CM118/pB10::mini-Tn5-*gfp3* en présence et en absence d'IPTG. Bactéries observées en microscopie à épifluorescence (A,C et E) et en contraste de phase (B, D et F) ($\times 1000$).

Les autres souches testées ont été transformées avec pB10::mini-Tn5-*gfp1* et les observations montrent que l'IPTG n'a que faiblement induit l'émission de fluorescence chez *S. meliloti* CM217 (Figure 27 A). L'émission de fluorescence est restée très sporadique chez *C. necator* CM224 (Figure 27 C) ou indétectable chez *P. aeruginosa* CM210 (résultat non montré). D'après ces résultats, il apparaît que la réponse à l'IPTG est variable d'une espèce à l'autre. Pour l'heure, l'hypothèse la plus probable permettant d'expliquer ces observations repose sur un problème de

transport de l'IPTG vers l'intérieur de la cellule, où l'absence de perméase LacY serait plus ou moins bien compensée selon l'espèce considérée (Hansen *et al.*, 1998). Il semble donc que l'IPTG ne soit pas le moyen idéal pour tester l'inductibilité de la fluorescence dirigée par le plasmide pB10::mini-Tn5-*gfp*-1. Une alternative aurait pu consister à introduire le plasmide dans deux souches isogéniques ne différant que par la présence ou l'absence du gène *lacI^q*. Dans le meilleur des cas, seule la souche sans LacI^q devrait fluorescer. Ces expérimentations n'ont pas été réalisées.

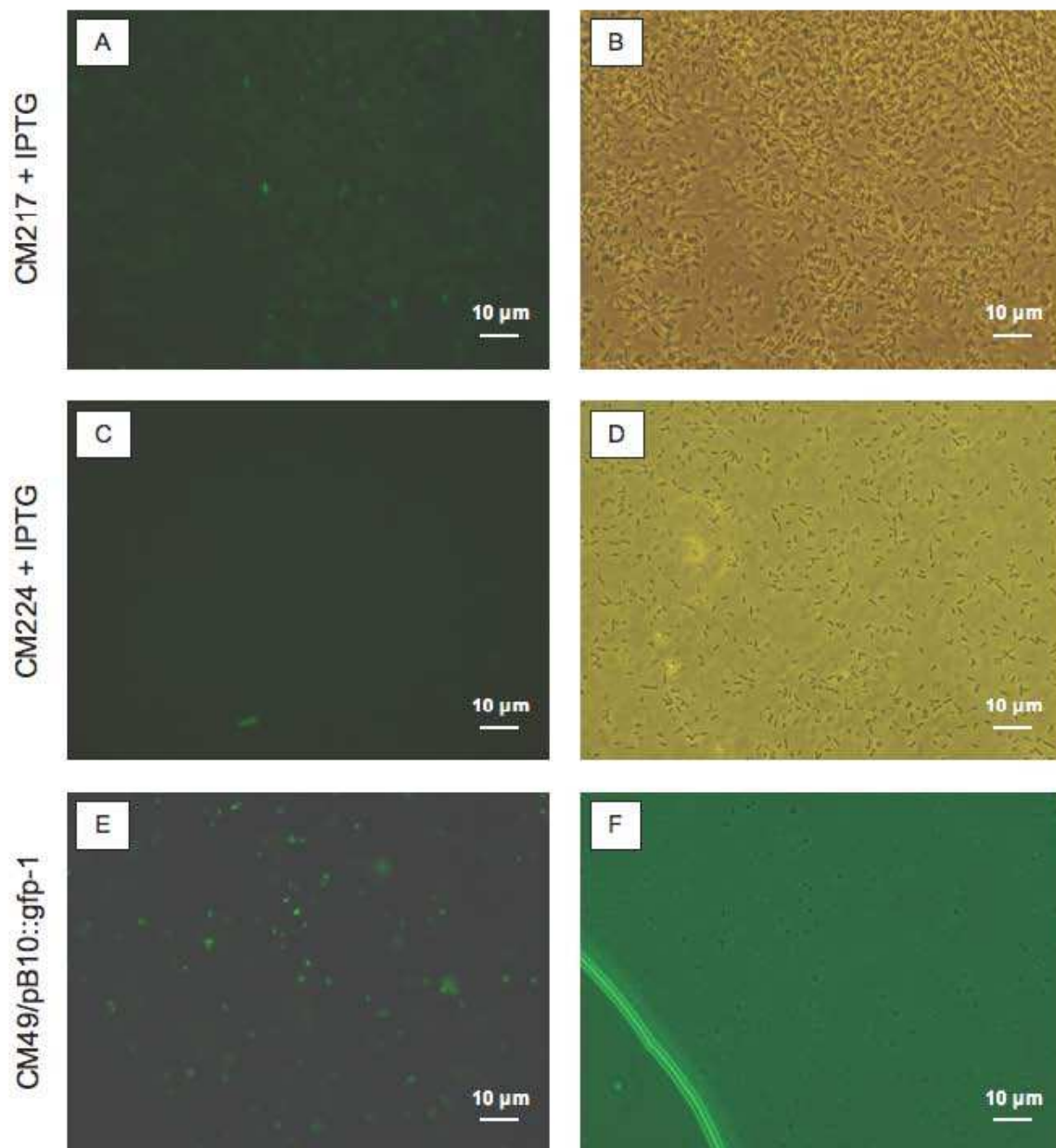


Figure 27 : Expression de la GFP chez *Sinorhizobium meliloti* (CM217), *Cupriavidus necator* (CM224) en présence d'IPTG et chez la souche transconjugante CM49/pB10::mini-Tn5-*gfp*1 sans IPTG. Bactéries observées en microscopie à épifluorescence (A, C et E) et en contraste de phase (B, D et F) ($\times 1000$).

4. Etude la faisabilité de la mesure de fluorescence

Le clone pB10::mini-Tn5-*gfp1* ayant été retenu comme étant le plus adapté pour suivre le transfert du plasmide par épifluorescence, des observations de fluorescence émise ont été effectuées avec des boues de STEP. Pour cela des boues biologiques préalablement dispersées par mixage ont été inoculées avec des *E. coli* CM155/pB10::mini-Tn5-*gfp1* ou des *P. putida* CM118/pB10::mini-Tn5-*gfp1* cultivées en présence d'IPTG. Les observations en microscopie n'ont pas permis de détecter de fluorescence. Le floc étant une structure dense, la fluorescence peut être masquée par la matrice. Un mixage des boues avant l'observation pourrait résoudre ce problème mais pourrait détruire une partie des bactéries et fausser les comptages. Parallèlement, l'observation de boues sans ajout de bactéries émettant de la fluorescence a montré une fluorescence intrinsèque des boues (Figure 28). Cette fluorescence génère un biais non négligeable qui peut fausser le comptage d'éventuelles bactéries présentes dans les boues, en particulier si la bactérie qui a reçu le plasmide n'exprime que faiblement la GFP. Au regard de l'auto fluorescence des boues et de l'absence de détection de bactéries fluorescentes dans ces boues, il s'est avéré que la technique développée par Geisenberger *et al.*, n'était sans doute pas la plus adaptée pour suivre le transfert de plasmide dans de telles matrices.

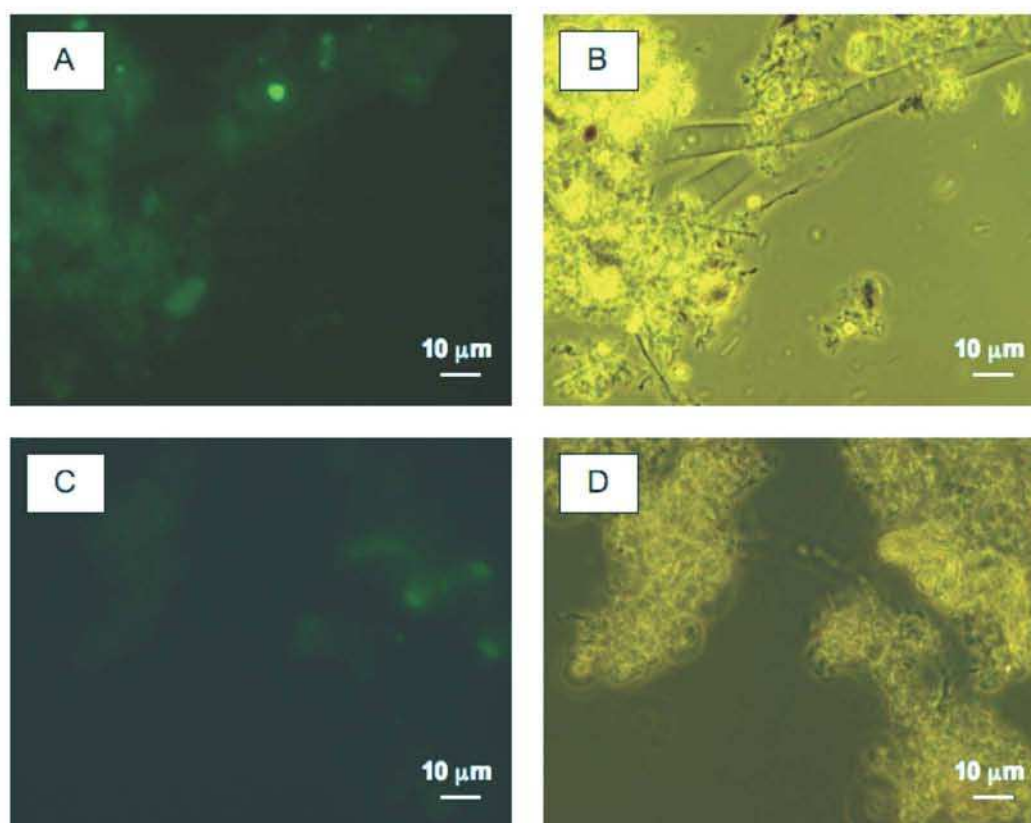


Figure 28 : Autofluorescence des boues biologiques. Boues observées en microscopie à épifluorescence (A et C) et en contraste de phase (B et D) ($\times 1000$).

III. Conclusion

Le plasmide pB10 est un plasmide intéressant pour cette étude dans le sens où il a été isolé de boues de STEP, qu'il appartient à une famille de plasmides ubiquitaires, et qu'il porte des gènes pour deux antibiotiques largement utilisés en médecine et présents en STEP (l'amoxicilline et le sulfaméthoxazole). Il présente une fréquence de transfert élevée et les tests réalisés au laboratoire montrent que ce transfert a lieu en quelques heures dans des conditions optimales.

En prenant l'option de suivre le transfert de pB10 par microscopie à épifluorescence, le plasmide a été mutagénisé par l'insertion d'un gène *gfp* contrôlé par un répresseur présent uniquement dans les bactéries de l'inoculum donneur. Les analyses ont pu montrer que l'insertion pouvait dans certains cas altérer le profil de résistance du plasmide vis-à-vis de la tétracycline. Des expériences de transfert menées sur le clone le plus adapté (pB10::mini-Tn5-*gfp1*) ont montré que l'insertion du transposon n'altérerait pas sa fréquence de transfert. En revanche, la présence du plasmide génétiquement modifié s'est avérée avoir une incidence sur la croissance de certaines bactéries hôtes, probablement en raison d'une accumulation intracellulaire toxique de la GFP comme chez *P. putida* CM118, ou alors en raison du fardeau énergétique généré par le plasmide lui-même comme chez *P. aeruginosa* CM150.

Outre ces effets sur les propriétés intrinsèques du plasmide ou sur la physiologie de la bactérie donneuse, le système génétique à proprement parlé doit être mis en œuvre avec l'allèle *lacI^q* du gène codant pour le répresseur du promoteur contrôlant le gène *gfp*. La surexpression du répresseur LacI par cet allèle est finalement la seule manière d'obtenir un contrôle suffisamment stringant sur l'émission de fluorescence et de ne pas avoir d'expression basale du gène *gfp* qui conduirait à confondre une bactérie donneuse pour un transconjugant.

Le clone de type 1 semblait remplir toutes les caractéristiques favorables à l'utilisation de la technique. Cependant, la détection de la fluorescence émise par les bactéries est rendue difficile par la complexité de la matrice. De plus l'autofluorescence des boues ne permet pas d'utiliser cette technique pour suivre le transfert de pB10 *in situ*, dans le sens où les biais engendrés seraient de ce fait beaucoup trop importants. Le système n'a cependant été testé que dans des boues et pourrait être fonctionnel dans d'autres types de matrices telles que les sédiments. Des essais en sédiments pourraient par conséquent montrer leur efficacité pour des suivis en environnement. Dans ce cas, l'insertion d'un gène *rfp* sur le chromosome bactérien de la cellule donneuse et exprimé constitutivement pourrait permettre de suivre l'évolution de la population de la bactérie donneuse au cours du temps.

Cette technique n'étant pas adaptée pour notre étude, une solution alternative a donc été envisagée.

Chapitre II. Suivi de transfert de pB10 par PCR quantitative

I. Sélection d'une méthode d'extraction et de purification d'ADN total de boues de STEP

L'extraction d'ADN est une étape clé dans les approches basées sur la biologie moléculaire car elle garantit la qualité de l'ADN pour une utilisation optimale dans des techniques telles que la PCR. Il s'agit en général d'obtenir un ADN en concentration importante, faiblement altéré par les étapes d'extraction et de purification, et contenant peu de contaminants susceptibles d'inhiber la réaction d'amplification par PCR. Dans cette optique, 10 techniques (et variantes) ont été testées afin d'identifier une méthode garantissant l'obtention d'ADN de boues utilisables en PCR. Pour ce faire, l'ADN total de boues de STEP a été extrait par les 10 techniques énumérées dans le tableau XII, à partir d'aliquots provenant d'un même échantillon (Boues biologiques de la STEP de Neuves Maisons). En outre, chacun des protocoles a été utilisé sur deux types de conditionnements de l'échantillon : le culot ou une liqueur qui correspond à un culot remis en suspension dans un volume équivalent de surnageant. Dans tous les cas, les échantillons ont été préalablement congelés à -80°C avant l'extraction. La qualité des ADN extraits a été analysée comme décrit dans la section « Matériels et Méthodes » selon 4 critères : leur concentration, la présence de contaminants co-extraits, leur intégrité et finalement leur capacité à être utilisés comme matrice dans une réaction de PCR (« amplificabilité »). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XII. D'un point de vue général si un critère est indicateur de bonne qualité, il n'est pas suffisant en lui-même pour pouvoir sélectionner une technique, et c'est finalement l'amplificabilité par PCR de l'ADN extrait qui reste le critère le plus important dans le choix final du protocole le plus adapté. Cependant, comme nous soupçonnions la fragmentation de l'ADN d'avoir une incidence sur l'aspect quantitatif de la PCR une attention particulière a été donnée à ce facteur. L'intégrité des ADN extraits a été estimée à partir des profils électrophorétiques obtenus sur gel d'agarose. Trois niveaux de fragmentation de l'ADN ont été arbitrairement définis comme résumé sur la figure 29 : ADN de bas poids moléculaires, ADN de haut poids moléculaires, et finalement ADN de tailles intermédiaires. La plus grande partie des protocoles testés a permis d'obtenir des ADN peu altérés par l'extraction. Cependant, les protocoles 2 et 4 ont engendrés une atteinte marquée de l'ADN extrait qui est apparu très fragmenté et donc peu intéressant pour une utilisation en PCR (Tableau XII).

Tableau XII : Rendement et pureté des ADN totaux de boues extraits selon 10 protocoles différents ^a

Méthodes d'extraction de l'ADN et références	Conditionnement de l'échantillon	[ADN] extrait (µg d'ADN / g matière sèche)	Pureté de l'ADN		Intégrité de l'ADN ^b	Amplificabilité par PCR ^c
			A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀		
(1) Sonication et extraction phénol/chloroform (selon la procédure 3 de Lemarchand <i>et al.</i> (2005) adaptée de Bourrain <i>et al.</i> (1999))	culot liqueur	288 ± 88 23 ± 6	0,78 ± 0,05 1,87 ± 0,13	1,68 ± 0,04 1,60 ± 0,11	+ +	0/6 0/6
(2) Lyse chimique : Guanidine isothiocyanate, EDTA, N-lauryl-Sarcosine (selon la procédure 5 de Lemarchand <i>et al.</i> (2005))	culot liqueur	<i>Non mesurable</i> <i>Non mesurable</i>	- -	- -	- -	0/6 0/6
(3) Dispersion de l'échantillon par sonication et extraction de l'ADN selon la procédure TL de Bourrain <i>et al.</i> (1999))	culot liqueur	37 ± 9 34 ± 3	1,03 ± 0,18 1,05 ± 0,07	1,23 ± 0,31 1,38 ± 0,05	+ +	0/6 0/6
(4) Broyage par microbilles et précipitation à l'acétate d'ammonium (selon la procédure 8 de Lemarchand <i>et al.</i> (2005), adaptée de Yu <i>et al.</i> (1999))	culot liqueur	57 ± 6 29 ± 8	0,93 ± 0,28 0,67 ± 0,09	1,25 ± 0,06 1,25 ± 0,10	- -	0/6 0/6
(5) Broyage par microbilles et extraction phénol/chloroforme (selon la procédure 9 de Lemarchand <i>et al.</i> (2005), adaptée de Guillaume <i>et al.</i> (2000))	culot liqueur	1308 ± 300 2688 ± 68	2,80 ± 0,57 1,89 ± 0,10	1,88 ± 0,04 1,65 ± 0,08	+/- +/-	0/6 0/6
(6) Broyage par microbilles et purification de l'ADN sur microcolonnes de Sépharose 4B (selon Martin-Laurent <i>et al.</i> (2001))	culot liqueur	483 ± 38 1494 ± 77	1,02 ± 0,11 0,88 ± 0,03	1,49 ± 0,11 1,44 ± 0,11	+ +	0/6 0/6
(7) Extraction d'ADN et précipitation des substances humiques au sulfate d'aluminium (selon Dong <i>et al.</i> (2006))	culot liqueur	6670 ± 521 12724 ± 813	0,78 ± 0,03 0,61 ± 0,23	1,42 ± 0,09 1,38 ± 0,08	+ +	0/6 0/6
(8) QIAamp DNA Stool® Mini Kit de QIAGEN (2002)	culot liqueur	841 ± 55 646 ± 8	1,45 ± 0,07 0,99 ± 0,01	1,99 ± 0,08 2,00 ± 0,13	+/- +/-	0/6 6/6
(9) Extraction d'ADN incluant une étape de lavage à l'acétone et l'éther de pétrole (selon Purohit <i>et al.</i>)	culot liqueur	10763 ± 3211 3178 ± 476	1,12 ± 0,13 0,46 ± 0,16	0,85 ± 0,04 0,74 ± 0,09	+ +	0/6 0/6
(10) Extraction d'ADN selon Porteous <i>et al.</i> (1997). Deux concentrations de guanidine isothiocyanate ont été testées: 5M pour les liqueurs #1 et 4M pour les culots et les liqueurs #2	culot liqueur (1) liqueur (2)	2282 ± 69 503 ± 120 722 ± 283	1,34 ± 0,13 1,60 ± 0,12 2,07 ± 0,14	1,4 ± 0,22 1,70 ± 0,09 1,90 ± 0,13	+ + +	0/6 0/6 6/6

^a Tous les protocoles (*cf.* annexes) ont été testés sur des aliquots provenant d'un même échantillon. Les écart-types ont été calculés à partir de 6 répétitions indépendantes pour chaque procédure.

^b (-): ADN de faibles poids moléculaires; (+) : ADN de hauts poids moléculaires; (+/-): ADN de tailles intermédiaires.

^c La fraction indique le nombre d'échantillons présentant une amplification PCR positive du gène 16S sur 6 essais au total.

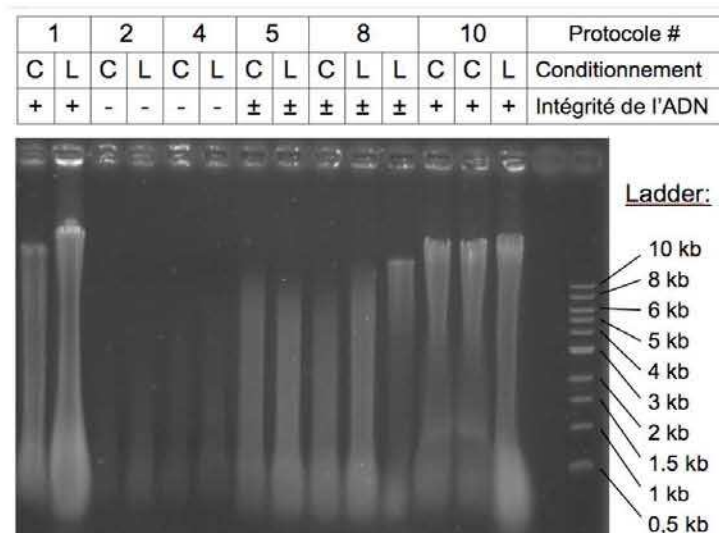


Figure 29 : Profils électrophorétiques représentatifs des extraits d'ADN totaux de boues extraits avec 6 protocoles différents (référéncés dans le tableau X). Les extractions d'ADN ont été réalisées sur des échantillons conditionnés en culot (C) et liqueur (L). (-): ADN de faibles poids moléculaires ; (+) : ADN de hauts poids moléculaires; (+/-) : ADN de tailles intermédiaires.

En second lieu, la concentration d'ADN extrait et la pureté de l'extrait ont été analysées spectrophotométriquement. Selon la technique considérée, le rendement d'extraction s'est avéré très variable, dans une gamme de concentrations s'échelonnant de 20 à 13000 µg d'ADN / g de matières sèches, sans pour autant que cette variabilité ait pu être reliée à un quelconque type de traitement physique ou chimique. Concernant la pureté des extraits, on observe là encore une variabilité importante des niveaux de contaminations chimiques plus ou moins marqués et de nature différente selon le protocole utilisé, ce qui explique en grande partie pourquoi aucun amplifiat n'a pu être obtenu lors des tests d'amplification PCR. Dans la plupart des cas, le conditionnement sous forme de liqueur n'a pas eu d'effet positif sur le rendement ou la pureté des extraits obtenus. On notera cependant que dans le cas des extractions réalisées selon la méthode de Porteous *et al.* (1997), le niveau de pureté s'est trouvé nettement amélioré pour les extraits réalisés à partir de liqueurs. Les raisons de cette amélioration reste énigmatique, on peut cependant formuler l'hypothèse que le trop faible contenu en eau dans les échantillons conditionnés sous forme de culots pourrait favoriser des réorganisations au niveau de la structure des agrégats conduisant à une plus grande désorption de molécules inhibitrices.

Si les mesures de pureté des ADN peuvent donner des indications sur le niveau de contamination et éventuellement sur un risque d'inhibition des réactions de PCR, un test d'amplification par PCR reste nécessaire pour le vérifier. Pour cette raison, des tests basés sur l'amplification de l'ADNr 16S ont été systématiquement réalisés sur l'ensemble des extraits obtenus. Ces tests ont pu montrer que seules deux des 10 techniques utilisées permettaient d'obtenir un ADN amplifiable. Il s'agit du kit

QIAamp DNA Stool et de la méthode adaptée de Porteous *et al.* (1997), pourvu que la concentration en guanidine isothiocyanate soit abaissée de 5 à 4 M dans la première étape de l'extraction. A notre connaissance, aucune étude n'a jamais attribué d'effets inhibiteurs à la guanidine isothiocyanate sur les réactions de PCR.

Au regard des résultats obtenus sur l'amplificabilité par PCR les deux techniques d'extractions, kit Qiagen et la méthode de Porteous, ont été retenues pour être plus amplement évaluées sur d'autres matrices environnementales : 2 nouvelles boues biologiques provenant des 2 STEP différentes (Maurepas et Plaisir, région parisienne), une boue décantée compressée (provenant de la STEP de Golbey, Lorraine), une boue de digesteur anaérobie (provenant de la STEP d'Evry, région parisienne) et des sédiments de rivière prélevés dans la Moselle à Golbey. Les ADN extraits ont été analysés comme précédemment et les résultats obtenus sont pour partie résumés dans le tableau XIII. Dans le cadre de cette nouvelle campagne d'extraction, les ADN obtenus avec le kit QIAamp DNA Stool n'ont pas pu être amplifiés par PCR et seuls les résultats obtenus à partir des ADN extraits selon la méthode de Porteous modifiée sont présentés.

Tableau XIII : Rendement et pureté des ADN extraits par la méthode adaptée de Porteous *et al.*

Origine et type d'échantillon	[ADN] (μg ADN /g de matières sèches)	Pureté de l'ADN		Intégrité de l'ADN ^b	Amplifica- bilité par PCR ^c
		A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀		
Boues biologiques (Bassin biologique, STEP de Maurepas, (78))	797 $\pm$ 544	1,88 $\pm$ 0,18	1,94 $\pm$ 0,23	+	3/3
Boues biologiques (Bassin biologique STEP de Plaisir, (78))	783 $\pm$ 290	1,83 $\pm$ 0,18	1,88 $\pm$ 0,18	+	3/3
Boues anaérobies (Digesteur anaérobie, STEP d'Evry, (91))	187 $\pm$ 89	1,78 $\pm$ 0,12	1,75 $\pm$ 0,21	+	3/3
Boues compressées (Presse de déshydratation, STEP de Golbey, (88))	4,4 $\pm$ 1,2 ^a	1,8 $\pm$ 0,01	1,84 $\pm$ 0,09	+	3/3
Sédiments de rivière (Moselle à Golbey, (88))	24,5 $\pm$ 5	1,96 $\pm$ 0,20	1,92 $\pm$ 0,12	+	3/3

^a La concentration en ADN est estimée en μg d'ADN par g de matière fraîche.

^b (-): ADN de faibles poids moléculaires; (+) : ADN de hauts poids moléculaires; (+/-): ADN de tailles intermédiaires.

^c La fraction indique le nombre d'échantillons présentant une amplification PCR positive du gène 16S sur 3 essais au total.

Les rendements d'extraction obtenus sont variables selon la matrice considérée. Ils sont maximaux pour les extractions réalisées à partir de boues biologiques (proche de 800 μg d'ADN/g de matières sèches) et minimaux pour les boues compressées et les sédiments (environ 25 μg d'ADN/g de matières sèches). Le rendement d'extraction pour un type de matrice reste équivalent selon l'origine du prélèvement, c'est en tout cas ce que semble indiquer les résultats obtenus pour les 3 boues biologiques d'origines différentes. La haute qualité des ADN extraits (en terme de pureté et d'intégrité) reste en revanche invariable quelque soit la matrice testée. Et l'ensemble des ADN

totaux ont pu être amplifiés, ce qui montre la qualité et la robustesse du protocole adapté de Porteous *et al.* (1997). Ce protocole a donc été définitivement retenu pour la suite de ce travail.

La technique d'extraction d'ADN environnementale ayant été identifiée et améliorée, la suite de la démarche « biologie moléculaire » pouvait être envisagée avec la mise au point d'un système de détection spécifique de pB10 et DH5 α par q-PCR. Dans ce but des couples amorces/sonde ont été développés.

II. Développement d'une méthode de détection et quantification des transferts de pB10 dans les communautés bactériennes environnementales par q-PCR

1. Elaboration d'amorces/sondes spécifiques pour la détection de pB10 et DH5 α par q-PCR

1.1. Identification de séquences cibles pour la détection spécifique pB10

Il s'agissait ici de localiser une région unique dans la séquence de pB10 qui pourrait servir « d'empreinte digitale » de ce dernier. Outre sa spécificité, cette zone devait avoir une taille maximale d'environ 200 paires de bases pour des raisons techniques liées à la PCR quantitative. La région ciblée pour l'amplification a été déterminée après une étude de la séquence ADN du plasmide pB10. Pour cela des recherches d'homologies de séquence avec d'autres séquences ADN présents en banque de données GENBANK ont été effectuées grâce à un logiciel d'alignement et de comparaison de séquences BLASTN 2.2.16 (Altschul *et al.*, 1997). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 30 et l'analyse des homologies par BLAST montre qu'il n'existe pas de séquence proprement unique à pB10. Ce plasmide apparaît comme une structure mosaïque combinant différents modules structuraux provenant de différentes origines. L'originalité de pB10 repose en fait sur l'arrangement de ces blocs et engendrant ainsi des jonctions uniques entre blocs. L'organisation globale de ces blocs est représentée sur la figure 30. Elle consiste en l'ossature classique de plasmide IncP β ayant acquis un intégron de classe I et 4 transposons présentant des degrés d'altération variables (Schlüter *et al.*, 2003). Les jonctions entre les blocs peuvent être facilement identifiées grâce aux comparaisons de séquences. Sept de ces jonctions (annotées de J1 à J7) ont pu être localisées dans la région des transposons et l'une d'elles (J3) a été utilisée pour élaborer un couple sonde/amorces spécifique de pB10 (Figure 31). Cette jonction se situe entre la partie tronquée du gène de la transposase *tnpA* du transposon Tn1721 et la partie tronquée du gène de la transposase *tnpA* de l'insertion de séquence IS1071. Ces versions incomplètes de gènes rendent impossible la transposition de l'élément, ce qui garantit la stabilité de cette jonction sur le plasmide.

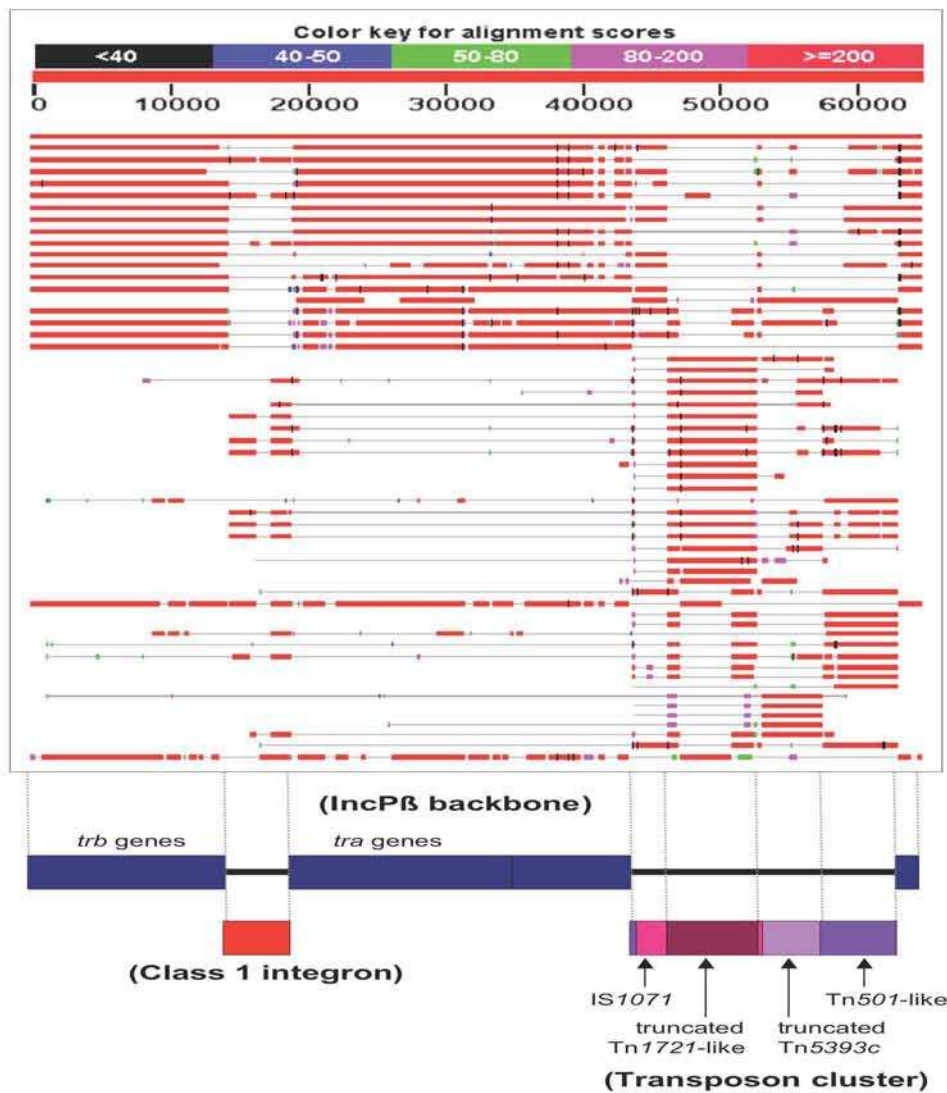


Figure 30 : Comparaison de la séquence complète de pB10 avec les bases de données ADN du comparateur de séquences en ligne BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les traits rouges symbolisent des séquences présentant une forte homologie avec pB10. Les discontinuités marquent une perte locale de similarité entre pB10 et la séquence comparée. La première ligne représente un alignement parfait de pB10 avec lui-même. Le plasmide pB10 est une structure mosaïque où l'originalité du plasmide repose sur l'enchaînement des différents blocs fonctionnels le composant, plutôt que sur les séquences de ces blocs proprement dit.

Une jonction spécifique ayant été défini il convenait désormais de tenir compte d'un autre paramètre directement lié au fonctionnement des transposons. Une analyse plus détaillée de la région des transposons a été réalisée pour la recherche de ces séquences répétées en combinant un ensemble de programmes en ligne tels que "REPFIND" (<http://zlab.bu.edu/repfind/form.html>), les applications "einvited" et "palindrome" de EMBOSS explorer (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/>), et "mreps" de SEQUOIA (<http://bioinfo.lifl.fr/mreps/mreps.php>), et en recherchant tous les alignements possibles de la région des transposons avec elle-même avec l'application "LALIGN" de EMBnet (<http://www.ch.embnet.org/index.html>). Ces analyses ont permis de montrer qu'il existe peu de séquences répétées, limitant donc les possibilités de recombinaisons

homologues dans cette région. Seules deux répétitions directes couvrant les deux gènes *tnpA* tronqués de *tn1721* sont situées à proximité de la jonction d'intérêt (J3). Cependant, même si une recombinaison entre ces deux répétitions devait avoir lieu, elle laisserait une copie intacte de la répétition et de ce fait la jonction resterait inchangée et toujours quantifiable par q-PCR.

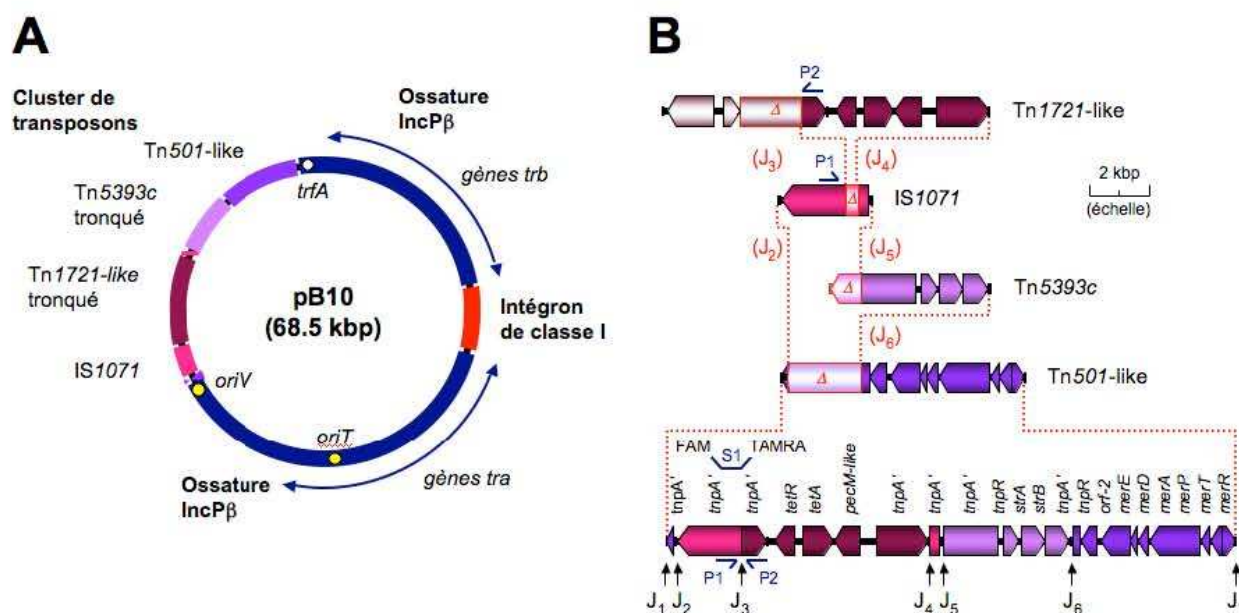


Figure 31 : Recherche de zones spécifiques sur la séquence de pB10 et élaboration de couples sonde/amorces : (A) représentation schématisée des différents blocs composant pB10. Le plasmide consiste en une ossature classique spécifique des plasmides IncPβ dans laquelle s'est inséré un intégron de classe I entre les groupes de gènes *trb* et *tra*, et une accumulation de 4 transposons incomplets entre l'*oriV* et le gène *trfA*. (B) Organisation génétique détaillée du « cluster » de transposons. Le « cluster » de transposons résulte de l'insertion successive de 4 éléments (Tn501-like, Tn5383c, IS1071, et Tn1721-like) et de la perte partielle de matériel génétique (indiquées par des séquences plus claires). La comparaison de séquence avec les transposons non altérés d'origine a mis en évidence différentes jonctions (J) entre chaque bloc. Les amorces utilisées pour la quantification de pB10 par q-PCR (P1 et P2) sont situées de part et d'autre de la jonction J3, et la sonde TaqMan (S1) est localisée entre ces deux amorces.

Une seconde stratégie a été envisagée pour la détection spécifique de pB10 par q-PCR. Celle-ci a consisté à utiliser les versions mutées de pB10 comportant une insertion de mini-Tn5-*gfp* (voir l'approche par épifluorescence, Partie III chapitre I) et à cibler le gène *gfp* pour l'élaboration d'amorces dans la mesure où il présente une faible probabilité de présence dans des boues de STEP (il s'agit d'un gène normalement présent chez la méduse *Aequorea victoria* (Prasher, 1995)). Pour cela la séquence du transposon mini Tn5-*gfp-mut3** inséré a été reconstituée et des jeux d'amorces et de sondes ont été conçus sur la séquence du gène *gfp-mut3**. Les séquences des amorces et des sondes sélectionnées sont indiquées dans le Tableau XIV.

Tableau XIV : Séquences nucléotidiques des couples d'amorces et des sondes retenus pour la PCR quantitative

	Séquence nucléotidique	Cible	Taille de l'amplicon (en paires de bases)
Amorces			
Tn	P1 5'-CAATACCGAAGAAAGCATGCG-3' P2 5'-AGATATGGGTATAGAACAGCCGTCC-3'	<i>tnpA</i> de l'IS1071	135
Gfp1	P5 5'-ATGGCCCTGTCCTTTTACC-3' P6 5'-CTTTTCGTTGGGATCTTTCG-3'	<i>gfpmut3*</i>	74
Gfp2	P7 5'-GATGGCCCTGTCCTTTTACC-3' P8 5'-CTTTTCGTTGGGATCTTTCG-3'	<i>gfpmut3*</i>	75
Gfp3	P9 5'-TGGCCCTGTCCTTTTACCAG-3' P10 5'-TCTTTTCGTTGGGATCTTTCG-3'	<i>gfpmut3*</i>	75
Sondes			
Tn1	S1 (FAM)5'-CCTCCACGGTGC GCGCTG-3'(TAMRA)	<i>tnpA</i> de l'IS1071	
Gfp1	S3 (FAM)5'-CCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCT-3'(TAMRA)	<i>gfpmut3*</i>	
Gfp2	S4 (FAM)5'-ACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTT-3'(TAMRA)	<i>gfpmut3*</i>	
Gfp3	S5 (FAM)5'-ACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCT-3'(TAMRA)	<i>gfpmut3*</i>	

Remarque : Les sondes S3, 4, et 5 sont interchangeables entre les trois couples d'amorces Gfp 1, 2 et 3.

1.2. Identification de séquences cibles pour la détection spécifique de DH5 α

La recherche de séquences spécifiques sur le génome de DH5 α a également été basée sur l'identification de jonctions uniques. La séquence de DH5 α n'est pas connue. Il a donc fallu la reconstituer à partir de la séquence du type sauvage *E. coli* K12 MG1655. Peters *et al.* (2003) dans leur travaux, ont utilisé la séquence de *E. coli* K12 MG1655 afin de déterminer la séquence de *E. coli* K12 MC4100 dont est dérivée DH5 α . La comparaison des séquences chromosomiques a montré qu'il existe des traits distinctifs entre les deux bactéries, parmi lesquelles la délétion (*argF-lac*) U169. Cette délétion correspond à la perte d'un fragment de 97239 paires de bases entre les gènes *mmuP* et *mhpD*. Apparemment, cette délétion fait suite à une recombinaison homologue entre deux répétitions directes de 10 paires de bases (GTCTGGCTGG) (Figure 32). La séquence a été reconstruite à partir des données du projet EcoMap 12 sur EcoGene (<http://ecogene.org/index.php>). L'unicité de la séquence a été vérifiée par recherches d'homologies de séquences avec d'autres séquences ADN grâce au logiciel d'alignement et de comparaison à des séquences multiples BLASTN 2.2.16 (Altschul *et al.*, 1997). Les amorces ont été élaborées selon la méthode décrite dans le chapitre « Matériels et Méthodes » et sont résumées dans le tableau XV.

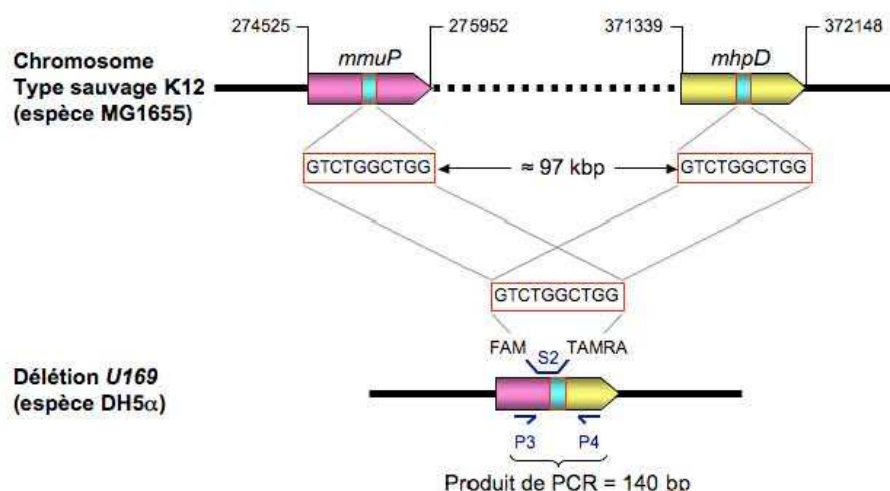


Figure 32 : Jeu d’amorces/sonde conçu pour la détection spécifique de DH5α par q-PCR. La délétion U169 résulte de la recombinaison homologue entre 2 répétitions directes de 10 paires de bases. La jonction créée a été utilisée pour l’élaboration d’amorces (P3 et P4) et d’une sonde (S2) spécifiques à DH5α situées de part et d’autres de cette jonction.

Tableau XV : Séquences nucléotidiques du couple d’amorces et de la sonde retenus pour la détection spécifique de DH5α par PCR quantitative.

Amorces ou sondes	Séquence nucléotidique	Cible	Taille de l’amplicon (en paires de bases)
Amorces			
P3	5’-ACCGGGTACATCATTTC-3’	<i>mmuP</i> de K12	140
P4	5’-GCCCCGGTAAGAATGAT-3’	<i>mhpD</i> de K12	
Sonde			
S2	(FAM)5’-CCTCCACGGTGCGCGCTG-3’(TAMRA)	Délétion U169	

2. Spécificité des couples d’amorces pour pB10 et DH5α

La spécificité de ces différents couples d’amorces vis-à-vis de leurs cibles a été estimée en PCR qualitative. Les couples d’amorces ont été utilisés pour des amplifications sur différents ADN totaux extraits de boues (STEP de Neuves-Maisons) et sédiments (Moselle, Golbey) avec ou sans adjonction préalable d’ADN de pB10 ou de DH5α. Ces tests ont montré la spécificité des différents couples pour pB10 (ou pB10::mini-Tn5*gfp* pour la version étiquetée) et DH5α : aucune amplification n’a été constatée en l’absence de l’ADN de pB10 et de DH5α dans les échantillons d’ADN totaux testés. Les mêmes réactions ont été effectuées en q-PCR sur de l’ADN total extrait de 20 échantillons environnementaux (dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau XVI) dans lesquels a été ajouté ou non de l’ADN de pB10 et de DH5α.

à 10^3 et 10^5 copies par réaction. Là encore, en absence des ADN cibles dans les ADN totaux, aucun signal de fluorescence n'a été détecté.

Tableau XVI : Origine des différents échantillons environnementaux d'où ont été extraits les ADN totaux

Echantillons	Origine	Site de prélèvement	Nombre d'échantillons testés
Boues biologiques	STEP de Neuves-Maison	Sortie de bassin biologique	6 (même site échantillonné 6 fois sur une période de 2 ans)
Boues biologiques	STEP de Maurepas	Bassin biologique	3 (même site de prélèvement échantillonné 3 fois)
Boues biologiques	STEP de Plaisir	Bassin biologique	3 (même site de prélèvement échantillonné 3 fois)
Boues compressées	STEP de Golbey	Presse de deshydratation	1
Sédiments	Moselle, Golbey	Lit de la rivière	14 (échantillonnés deux fois à 7 sites différents)

Ce point étant résolu, notre travail a ensuite consisté à optimiser les conditions de q-PCR.

3. Efficacité de PCR des différentes combinaisons sonde/amorces

3.1. Efficacité de PCR des combinaisons sondes/amorces pour la détection de pB10

L'efficacité de PCR pour les combinaisons sonde/amorces a été estimée afin de sélectionner les meilleures combinaisons. Dans ce but, des réactions de q-PCR ont été réalisées en faisant varier le nombre de copies du plasmide pB10 (digéré par *Bam*HI et purifié) dans une gamme de concentrations variant de 10^5 copies à 10 copies par réaction avec les différents couples d'amorces/sonde. Pour chaque concentration, 3 réactions de q-PCR ont été réalisées. Les résultats sont présentés sur les figures 33-A, 33-B, 34-C et 34-D.

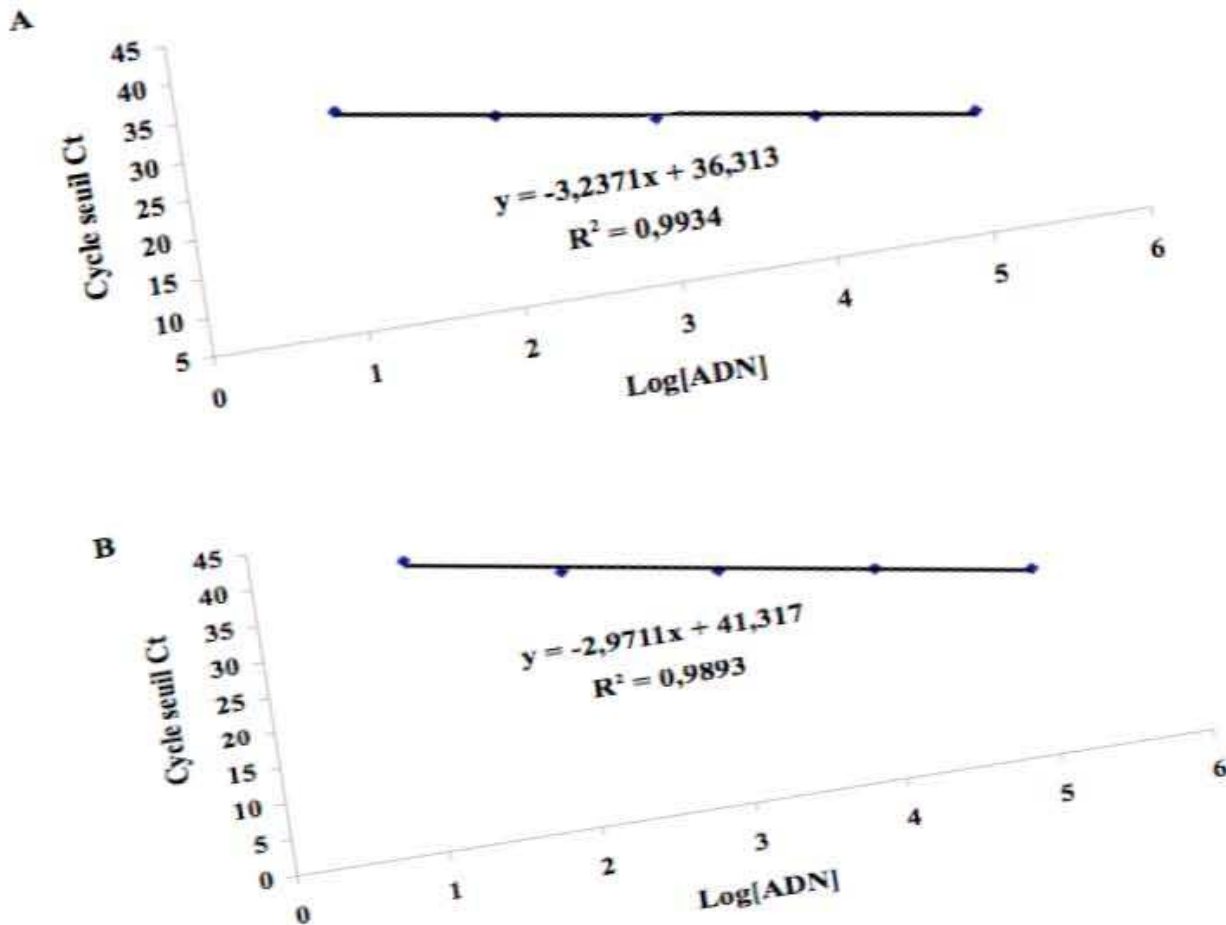


Figure 33 : Estimation de l'efficacité de la q-PCR avec les combinaisons sonde/amorces Tn (A) et Gfp1 (B).

Conventionnellement, l'efficacité e de la réaction est calculée selon la relation

$$e = (10^{(-1/\text{pente})} - 1) * 100$$

où la pente correspond au coefficient directeur de la droite de régression établie sur une courbe étalon entre les valeurs de Ct (cycle seuil de détection) et le log de la concentration en ADN correspondant. Idéalement une efficacité de 100% signifie qu'à chaque cycle la quantité de produits PCR double, ce qui correspond à une pente de -3,33 sur la courbe étalon (cette valeur correspond à $1/\log 2$ qui représente le pas optimum entre deux Ct successifs obtenus pour deux concentrations d'ADN successives dans une gamme de dilutions au dixième). Selon les critères définis dans la norme XP NF T90-471, les amplifications PCR sont généralement considérées comme bonnes lorsque l'on obtient un coefficient de corrélation $R^2 > 0,99$ et une efficacité comprise entre 75 et 125 %. Pour cela la pente de la droite de régression doit être comprise

entre -4,115 et -2,839. En dehors de cette fourchette, le système ne peut être considéré comme valide (Norme XP NF T90-471).

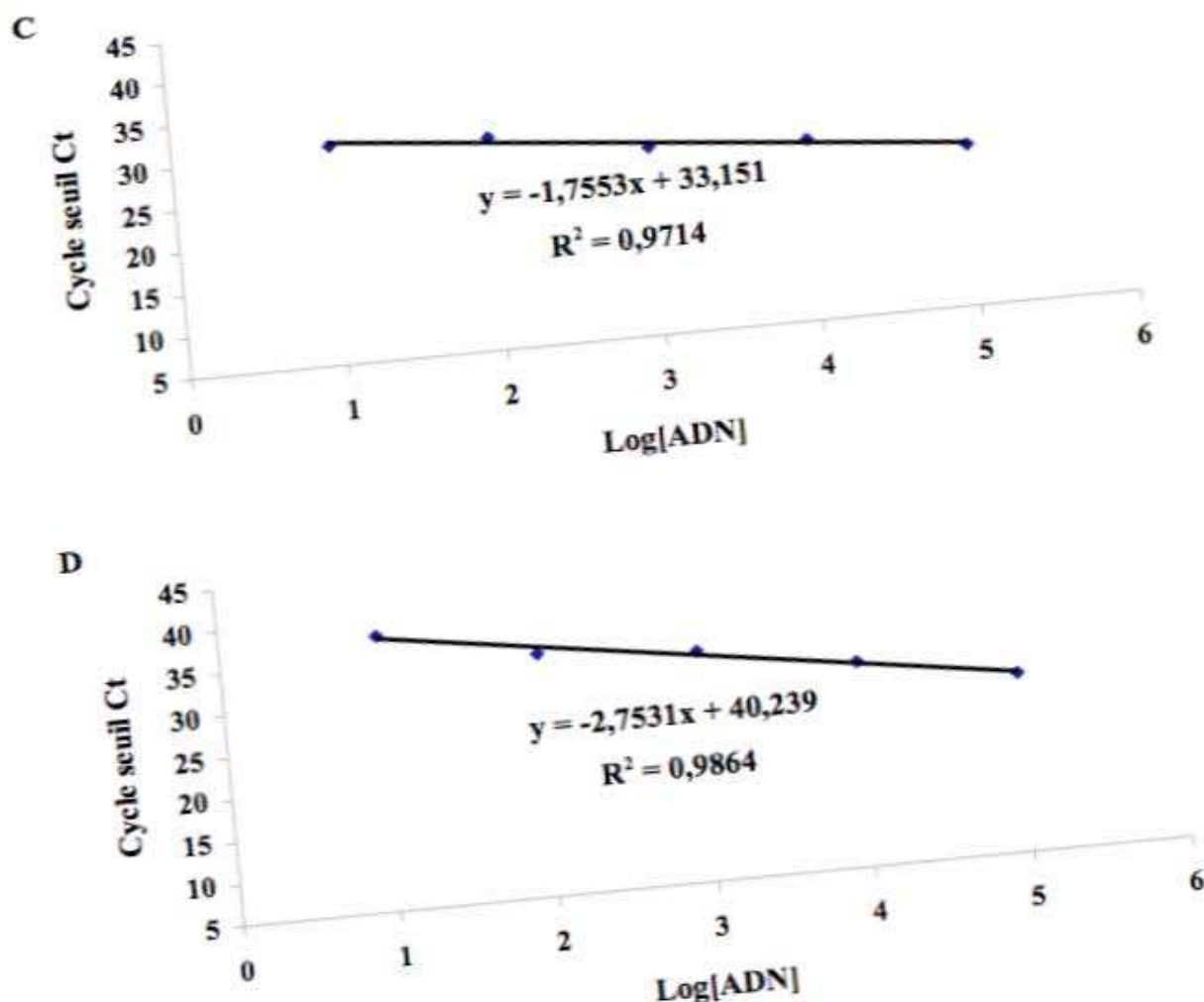


Figure 34 : Estimation de l'efficacité de la q-PCR avec les combinaisons sonde/amorces Gfp2 (C) et Gfp3 (D).

Les figures 33-A, 33-B, 34-C et 34-D représentent les courbes obtenues avec les 4 combinaisons amorces/sonde Tn, Gfp1, Gfp2 et Gfp3. D'emblée, il apparaît que la pente de la droite de régression pour la combinaison Tn, égale à -3,0326, est proche de la valeur idéale de -3,33 et l'efficacité calculée est égale à 103% (proche de la valeur idéale 100 %). Cela signifie que les valeurs de Ct obtenues sont en corrélation avec la gamme de dilution des ADN. Pour ce qui est de la combinaison Gfp1, le coefficient directeur égal à -2,9711, montre une efficacité d'amplification égale à 117 % moins bonne. Enfin les valeurs obtenues pour les systèmes Gfp2 et Gfp3 égales à -1,7553 et -2,7531 respectivement sont en dehors de la fourchette de valeurs définies par les normes. Par conséquent les combinaisons amorces/sonde Gfp2 et Gfp3 n'ont

pas été retenues pour l'approche par PCR quantitative. Parmi les deux autres combinaisons amorces/sonde la combinaison Tn donnant les meilleurs résultats a été retenue pour la suite de notre étude. L'utilisation de ce jeu d'amorces/sonde a donc été optimisé afin d'obtenir les meilleures conditions de détection.

3.2. Efficacité des combinaisons sonde/amorces pour la détection de DH5α

La même procédure que celle décrite dans le paragraphe précédent a été répétée pour le système sonde/amorces spécifique à DH5α en utilisant de l'ADN chromosomique de *E. coli* DH5α comme matrice ADN dans les réactions de q-PCR. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 35. La pente de la droite de régression égale à -3,639 est comprise dans la fourchette des valeurs acceptables et permet donc de valider la réaction de PCR. L'efficacité de PCR calculée est égale à 88%. Le système développé est donc performant pour la détection de la bactérie donneuse.

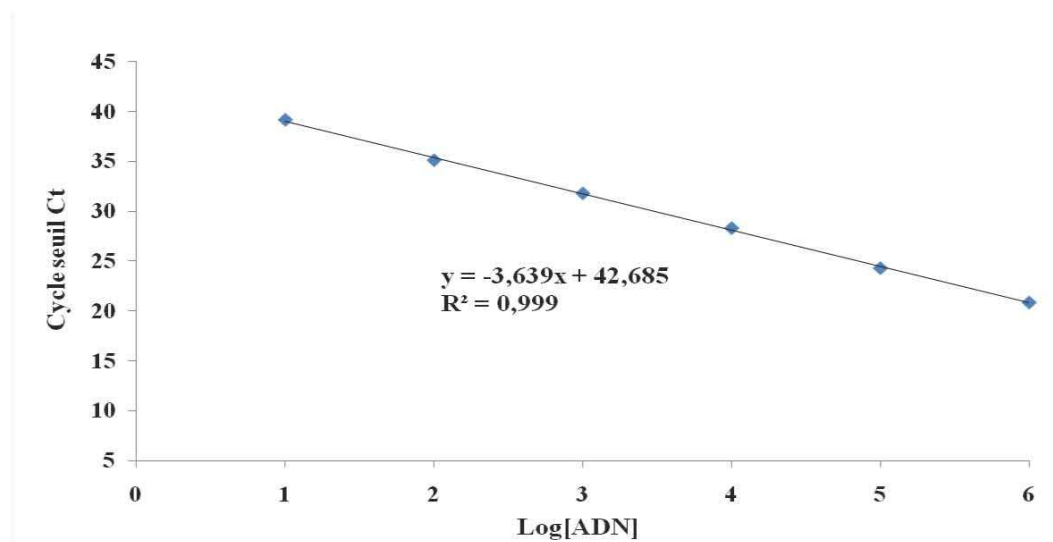


Figure 35 : Estimation de l'efficacité de la q-PCR avec la combinaison sonde/amorces DH5α.

Les combinaisons de sonde/amorces spécifiques du plasmide et de la bactérie donneuse sélectionnées ont donc été optimisées pour améliorer la détection des ADN cibles.

4. Optimisation des conditions de q-PCR avec les couples retenus (variation des concentrations, sonde/amorces / ADN par puits)

Il s'agissait ici d'optimiser les concentrations en sonde, amorces et de définir la concentration d'ADN total optimale à utiliser pour la détection par q-PCR afin d'être le plus sensible possible. Pour cela différents essais ont été réalisés en faisant varier successivement les concentrations de la sonde, des amorces puis de l'ADN total par réaction de q-PCR.

4. 1. Optimisation des conditions de q-PCR pour la détection de pB10

4.1.1. Détermination des concentrations optimales d'amorces pour la détection de pB10

Trois séries de 3 réactions de q-PCR ont été réalisées avec des concentrations en amorces variables et égales à 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 0,9 et 1 μM respectivement. Les réactions ont été menées sur de l'ADN de pB10 pur apporté à raison de 10^3 copies par réaction. Les résultats sont présentés sur la figure 36. On observe que selon la concentration en amorces, la sensibilité de détection peut varier. Pour une concentration en amorces égale à 0,6 μM , la valeur du Ct est la plus haute (égale à 31,8) et cette valeur de Ct diminue lorsque la concentration en amorces est supérieure ou égale à 0,7 μM dans le milieu réactionnel. La meilleure détection est obtenue pour une concentration en amorces égale à 0,8 μM où la valeur de Ct est égale à 28,5 soit un écart de plus d'un cycle avec les autres concentrations en amorces testées. Par conséquent les PCR seront réalisées avec une concentration en amorces égale à 0,8 μM .

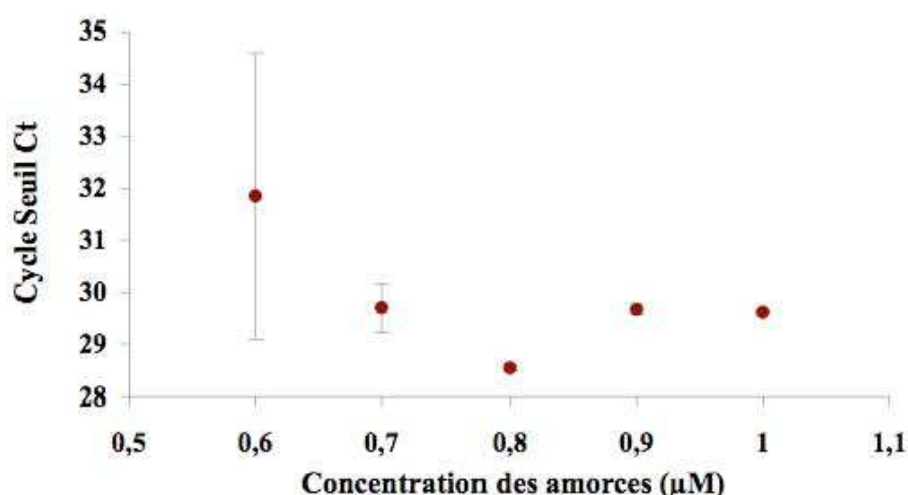


Figure 36 : Optimisation de la concentration des amorces Tn pour la détection de pB10

Chaque concentration d'amorces a été testée dans 3 réactions de q-PCR indépendantes, chacune réalisée en triplicat sur de l'ADN de pB10 apporté à 10^3 copies par réaction. La valeur représentée correspond à la moyenne des 3 moyennes de réaction et la barre d'erreur représente l'écart-type, entre les moyennes.

4.1.2. Détermination de la concentration optimale de sonde pour la détection de pB10

Trois séries de 3 réactions de q-PCR ont été réalisées en faisant varier la concentration en sonde à 0,2 ; 0,3 et 0,4 μM . Les réactions ont été menées sur de l'ADN de pB10 pur apporté à raison de 10^3 copies par réaction. Les résultats sont présentés sur la figure 37.

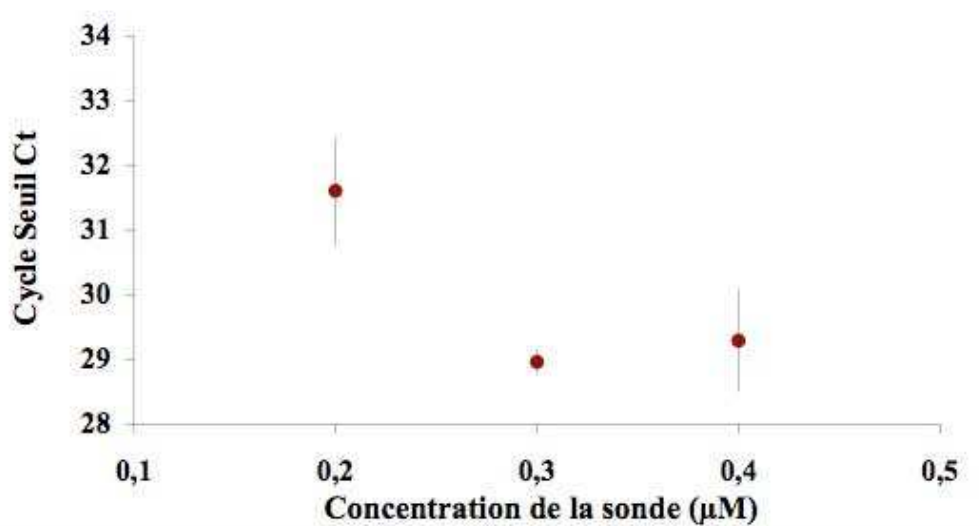


Figure 37 : Optimisation de la concentration de la sonde Tn pour la détection de pB10

Chaque concentration de sonde a été testée dans 3 réactions de q-PCR indépendantes, chacune réalisée en triplicat sur de l'ADN de pB10 apporté à 10^3 copies par réaction et à concentrations d'amorces fixes (égale à $0,8\mu\text{M}$). La valeur représentée correspond à la moyenne des 3 moyennes de réaction et la barre d'erreur représente l'écart-type, entre les moyennes.

Dans ce cas on observe qu'il n'y a pas de différence marquée pour des concentrations en sonde égale à $0,3$ et $0,4\mu\text{M}$, les Ct ne différant que de $0,3$ seulement. En revanche l'écart-type étant moins important pour une concentration en sonde de $0,3\mu\text{M}$, les PCR seront réalisées à cette concentration.

4.1.3. Détermination de la concentration d'ADN totale optimale pour la détection de pB10

Une série d'expériences a été réalisée afin de déterminer si une augmentation de la concentration en ADN matrice engagée dans la réaction de q-PCR pouvait améliorer la sensibilité de détection de l'ADN cible. Il s'agissait donc ici de trouver le meilleur compromis entre une concentration d'ADN matrice la plus élevée possible et une réaction d'amplification optimale. Pour cela, 3 échantillons d'ADN de boues provenant de microcosmes inoculés avec DH5 α /pB10 (400 UFC/mL de boues) ont été utilisés pour tester l'efficacité de la détection de pB10 à partir de réactions de q-PCR réalisées sur une gamme de concentrations d'ADN variant de 50 à 500 ng/réaction (50 μL). Les résultats sont présentés dans la figure 38.

Les résultats obtenus montrent que, pour les 3 essais, le nombre de copies de pB10 détecté est proportionnel à la quantité d'ADN apportée jusqu'à une concentration comprise entre 125 et 250 ng/ réaction de PCR. Au-delà de cette concentration cette proportionnalité n'est plus respectée et l'on observe une phase plateau. Ces expériences indiquent qu'au-delà de 125 ng d'ADN/ réaction, il n'y a plus de relation linéaire entre la concentration en ADN pB10 engagée

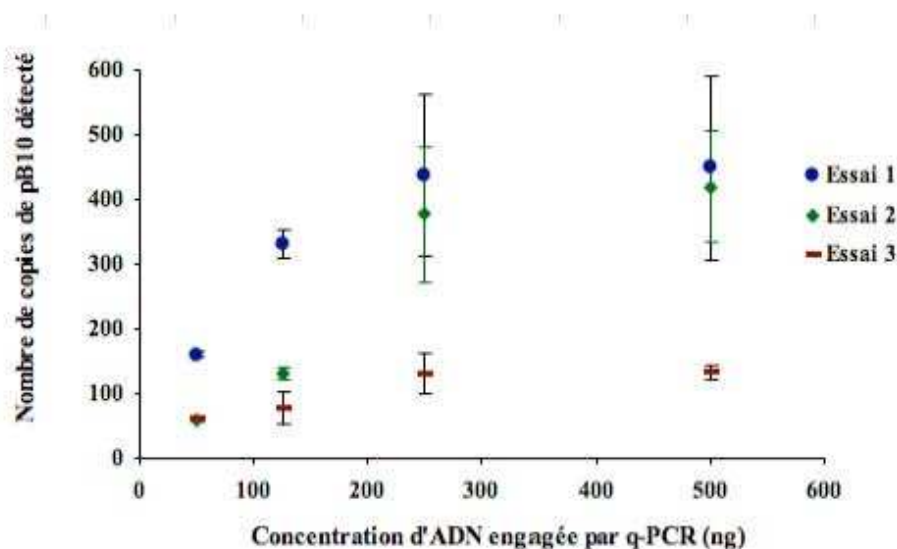


Figure 38 : Détermination de la concentration d'ADN matrice optimale pour la détection de pB10 par q-PCR. Chaque concentration d'ADN total a été testée dans une réaction de q-PCR réalisée en triplicat. Les concentrations d'amorces et de sonde sont fixes (égales à 0,8 μ M et 0,3 μ M respectivement). La valeur représentée correspond la moyenne des 3 valeurs de PCR.

et la concentration d'ADN total avec une perte de la sensibilité de détection entraînant une sous estimation du nombre de copies de pB10 réellement présent. Deux causes peuvent être à l'origine de cette inhibition de la réaction de PCR. La première repose sur la concentration d'ADN trop importante qui entraînerait une accessibilité aux cibles ADN plus difficile. La seconde serait que plus on augmente la concentration en ADN, plus on apporte de contaminants co-extraits, ces derniers pouvant être de puissants inhibiteurs de la Taq polymérase. On observe également que d'un essai à l'autre la concentration détectée est variable et ce malgré un inoculum bactérien initial identique. Et dans la zone de linéarité concentration présente/ concentration détectée, plus on augmente la concentration d'ADN total engagée par réaction de q-PCR, plus la variation entre concentration présente/ concentration détectée en q-PCR est importante. Elle est la moins marquée pour une concentration d'ADN total égale à 50 ng par réaction de q-PCR.

Considérant ces possibles phénomènes d'inhibitions, par sécurité, les amplifications PCR seront réalisées avec 50 ng d'ADN matrice.

4. 2. Optimisation des conditions de PCR pour la détection de DH5 α

4.2.1. Détermination des concentrations optimales d'amorces pour la détection de DH5 α

La même démarche que celle décrite dans le paragraphe 4.1.1 a été répétée en utilisant les combinaisons sonde/amorces DH5 α sur de l'ADN chromosomique de DH5 α . Les résultats

obtenus sont résumés sur la figure 39. Le meilleur seuil de détection est obtenu pour des concentrations en amorces variant de 0,7 à 0,9 μM où les valeurs de Ct sont comprises entre 31 et 32 cycles avec la valeur la plus basse pour une concentration en amorce à 0,8 μM . Ainsi, la concentration en amorces retenue est de 0,8 μM .

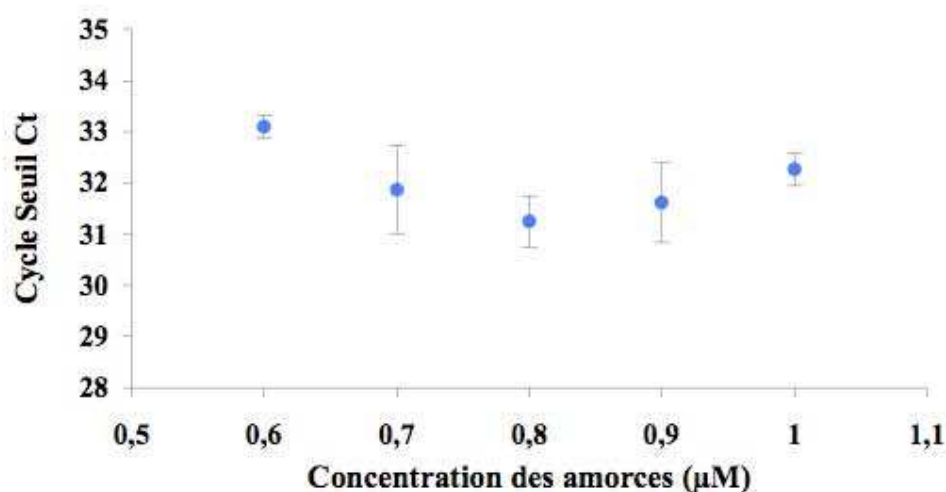


Figure 39 : Optimisation de la concentration des amorces DH5 α pour la détection de DH5 α . Chaque concentration d'amorces a été testée dans 3 réactions de q-PCR indépendantes, chacune réalisée en triplicat sur de l'ADN de pB10 apporté à 10^3 copies par réaction. La valeur représentée correspond à la moyenne des 3 moyennes de réaction.

4.2.2. Détermination de la concentration optimale de sonde pour la détection de DH5 α

Les réactions ont été menées comme décrit dans le paragraphe 4.1.2. avec de l'ADN chromosomique de DH5 α pur apporté à raison de 10^3 copies par réaction. Les résultats sont présentés sur la figure 40. Comme précédemment observé pour pB10, en dessous d'une concentration en sonde égale à 0,3 μM la détection est moins performante. Si l'on augmente la concentration, il n'y a pas de variation notable, la détection a tendance à devenir moins bonne et la variation des mesures devient plus importante. La meilleure détection étant obtenue pour une concentration en sonde égale à 0,3 μM , les réactions de q-PCR à venir seront donc réalisées à cette concentration.

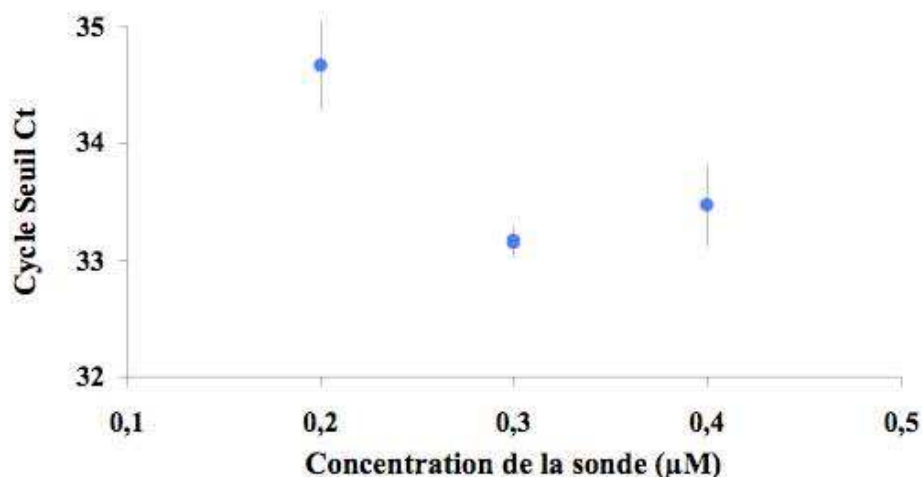


Figure 40 : Optimisation de la concentration de la sonde DH5 pour la détection de DH5α.

Chaque concentration de sonde a été testée dans 3 réactions de q-PCR indépendantes, chacune réalisée en triplicat sur de l'ADN de DH5α apporté à 10^3 copies par réaction et à concentration d'amorces fixes (égale à 0,8 μM). La valeur représentée correspond à la moyenne des 3 moyennes de réaction.

4.2.3. Détermination de la concentration d'ADN total optimale

Les essais ont été menés comme développé dans le paragraphe 4.1.3. Pour cela, 3 échantillons d'ADN de boues provenant de microcosmes inoculés avec DH5α/pB10 (400 UFC/mL de boues) ont été utilisés pour tester l'efficacité de la détection de DH5α à partir de réactions de q-PCR réalisées sur une gamme de concentrations d'ADN variant de 50 à 500 ng/réaction (50 μL). Les résultats sont présentés dans la figure 41.

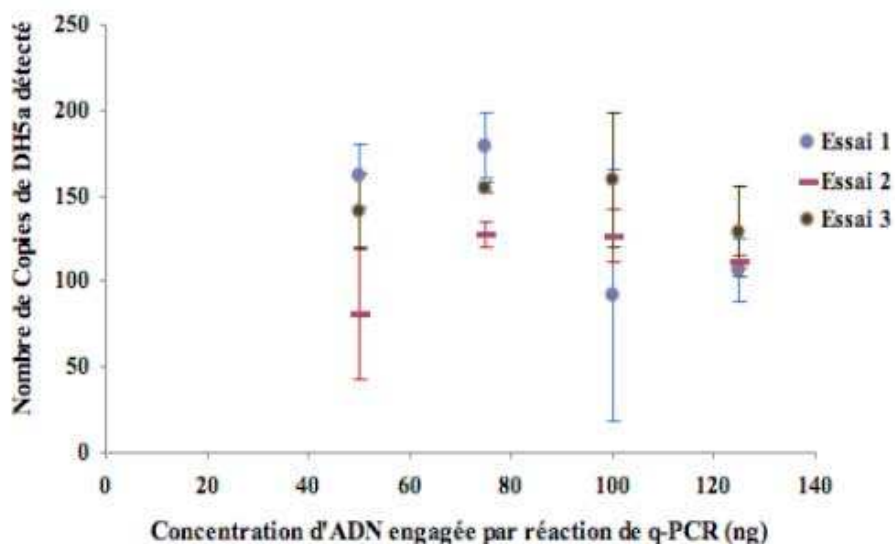


Figure 41 : Détermination de la quantité optimale d'ADN par PCR pour la détection de DH5α.

Chaque concentration d'ADN total a été testée dans une réaction de q-PCR réalisée en triplicat. Les concentrations d'amorces et de sonde sont fixes (égales à 0,8 μM et 0,3 μM respectivement). La valeur représentée correspond à la moyenne des 3 valeurs de PCR.

Les résultats montrent que la détection est la meilleure, et ce pour les 3 essais, lorsque la concentration d'ADN total engagée est égale à 75 ng. A des concentrations d'ADN par réaction de PCR supérieures ou inférieures, les nombres de copies détectés sont inférieurs et les écarts-types pour chaque détection sont très importants. Pour des concentrations inférieures, c'est le manque d'ADN qui doit être la raison de cette sous-estimation. Pour des concentrations supérieures l'accessibilité aux ADN cibles ou la concentration en inhibiteurs dans l'échantillon peuvent expliquer la baisse de la sensibilité de détection. Par conséquent, les PCR seront effectuées avec des concentrations en ADN total égale à 75 ng par réaction de PCR.

5. Définition des seuils de détection

Les systèmes étant optimisés, l'étape suivante fut de déterminer les limites de détection de la méthode. Trois types de limites ont été définis : la limite théorique, la limite de détection sur ADN cible pur et la limite de détection en matrice environnementale dans un mélange d'ADN complexe. La limite de détection théorique correspond à une copie d'ADN cible. Les deux autres ont été déterminées grâce à des essais.

5. 1. Définition des seuils de détection sur ADN cible pur

5.1.1. Définition des seuils de détection

La limite de détection sur ADN pur a été déterminée comme suit : des réactions de q-PCR ont été réalisées sur 1 à 10^6 copies d'ADN cible par réaction. Le but étant de déterminer à partir de quand on observe plus de signal de fluorescence et ainsi définir la limite de détection. Les essais ont été répétés 3 fois et chaque q-PCR a été réalisée en triplicat. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 42. Les valeurs présentées correspondent à la valeur moyenne des 3 essais. On observe que pour la détection de pB10, le système nous permet de détecter jusqu'à une copie de plasmide par réaction à une valeur de Ct moyen égale à $38,4 \pm 1,03$. Cependant, on observe une perte de linéarité dans la détection en dessous de 10 copies par réaction. Pour des dilutions inférieures à 1 copie, aucun signal de fluorescence n'est détecté ($Ct \text{ moyen} = 44,94 \pm 0,102$).

Les résultats obtenus avec le système de détection de DH5 α montrent que l'on a une relation linéaire jusqu'à un équivalent de 15 copies de génome par réaction. En deçà de cette concentration, aucun signal de fluorescence n'est observé. La limite de détection est par conséquent égale à 15 copies de génome pour un Ct moyen égal à $40,27 \pm 0,65$.

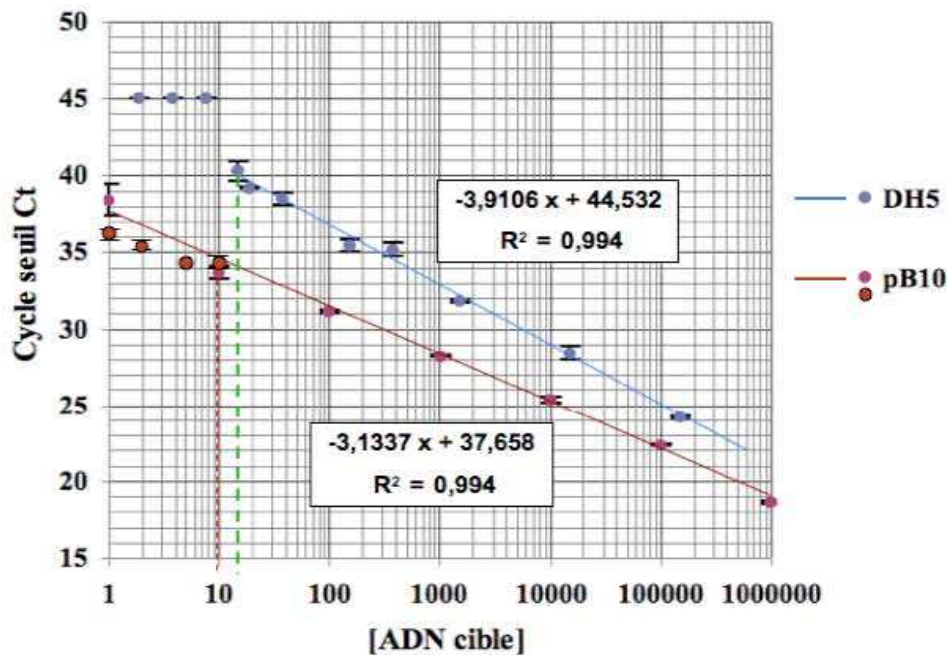


Figure 42 : Détermination de la limite de détection sur ADN cible pure pour pB10 et DH5α. Chaque concentration d'ADN a été testée dans 3 réactions de PCR réalisée en triplicat. La valeur représentée correspond à la moyenne des 3 valeurs de PCR. Pour pB10, les deux couleurs représentent deux essais indépendants mais réalisés à partir des mêmes ADN.

Les seuils de détection étant définis, il était alors nécessaire de définir les variations inter et intra-essais.

5.1.2. Variations intra et inter-essais

Dans le but de valider les protocoles de détection développés, les variations intra et inter-essais des PCR quantitatives ont été évaluées. Cette estimation est basée sur le calcul du coefficient de variation (CV) obtenu à partir des valeurs moyennes des Ct et des valeurs des écarts-types associés. Le CV est calculé selon la formule :

$$CV (\%) = (\text{écart-type} / \text{Moyenne}) * 100$$

Dans ce but, des gammes de dilution ont été réalisées à partir d'ADN purs de pB10 et DH5α.

5.1.2.1. Variations intra-essais

La variation intra-essais est évaluée en amplifiant différents points de gamme (10^6 à 1 copie par réaction) 8 fois lors de la même réaction de PCR. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Estimation des variations intra-essais : valeurs de coefficients de variation

Nbre de copies/réaction	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1
CV pB10 (%)	0,43	0,47	0,28	0,33	0,33	0,11	0,12
CV DH5α (%)	0,5	0,39	0,57	0,73	0,83	-	-

CV calculés sur 8 répétitions par point de gamme ; (-) aucun signal de fluorescence détecté.

Pour les 2 systèmes de détection par q-PCR développés, les CV sont inférieurs à 1% variant de 0,11 à 0,47 % pour pB10 et de 0,83 à 0,5 % pour DH5α. Ces valeurs sont bien inférieures à la valeur limite de 2 % conventionnellement admise dans ce type d'essai. Par conséquent, elles reflètent une bonne qualité de la détection.

5.1.2.2. Variations inter-essais

La variation inter-essais a été évaluée en amplifiant différents points de gammes de dilution sur ADN pur des deux cibles (10⁶ à 1 copie par réaction pour pB10, 10⁵ à 10² pour DH5α) au cours de 11 réactions de PCR indépendantes. Les résultats sont présentés dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII : Estimation des variations inter-essais : valeurs de coefficients de variation

Nbre de copies/réaction	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1
pB10	1,03	1,07	1,38	1,26	1,57	1,2	0,48
DH5α		2,09	2,06	1,97	1,97		

CV calculés sur 11 répétitions indépendantes par point de gamme

De manière générale, le système de détection de pB10 semble plus répétable que celui de DH5α avec des CV variant de 0,48 à 1,57%. Les valeurs de CV élevés mais proches de 2 pour le système de détection de DH5α permettent cependant de le valider.

Les seuils de détection sur ADN purs étant estimés, il était important de déterminer les seuils de détection dans les différentes matrices environnementales en considérant l'étape préalable d'extraction et de purification de l'ADN total.

6. Sensibilité globale de la méthode

Les couples sonde/amorces développés nous permettent désormais de détecter le plasmide pB10 et la bactérie donneuse DH5 α avec une grande spécificité dans des mélanges complexes d'ADN environnementaux. L'étape de détection fait suite à l'étape préliminaire d'extraction et de purification de l'ADN. Au cours de cette étape, les différents traitements que subit l'échantillon peuvent endommager l'ADN et le rendement peut être variable. Il pourrait donc y avoir une incidence importante sur le nombre final d'ADN cibles détectés par PCR quantitative. C'est par conséquent la sensibilité de la méthode globale qu'il faut définir. L'objectif étant de déterminer quelle part de la quantité de plasmide et de bactérie donneuse initialement ajoutée est détectée en q-PCR après extraction des ADN totaux.

Dans ce but, des microcosmes (dont les caractéristiques sont décrites dans le chapitre « Matériels et Méthodes ») ont été élaborés avec des boues biologiques de Neuves-Maisons et ont été inoculés avec différentes concentrations de DH5 α /pB10 variant de $2,9.10^6$ UFC/ 800 mL à $2,9.10^9$ UFC/ 800 mL de boues. Un volume de l'échantillon (50 mL) a été immédiatement prélevé et l'ADN total a été extrait puis analysé en q-PCR pour déterminer les nombres de copies de pB10 et DH5 α détectés. En fonction du nombre de copies détecté et du nombre de copies attendu il est possible d'estimer la sensibilité globale de notre méthode. Les nombres de copies attendues de pB10 et DH5 α dans l'extrait d'ADN obtenu ont été calculés en partant du principe que chaque cellule contient 5 à 15 copies du plasmide pB10 et une copie d'ADN chromosomique (Adamczyk et Agura-Burdzy, 2003 ; Adamczyk *et al.* 2006). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 43. La relation linéaire entre la concentration d'ADN attendue et la concentration d'ADN mesurée montre qu'en dépit d'un rendement limité de la récupération et la quantification d'ADN, où 1-1,5 % des cellules inoculées DH5 α sont détectés par q-PCR, son évolution reste représentative de la réalité. Dans les deux cas de la détection de DH5 α et de pB10, il existe une relation de proportionnalité entre le nombre de copies détecté et celui réellement présent, ceci quelle que soit la dose initialement inoculée. Ainsi, toute fluctuation du nombre de copies mesuré sera le reflet d'une fluctuation dans l'échantillon même si il reste sous-estimé en valeur absolue.

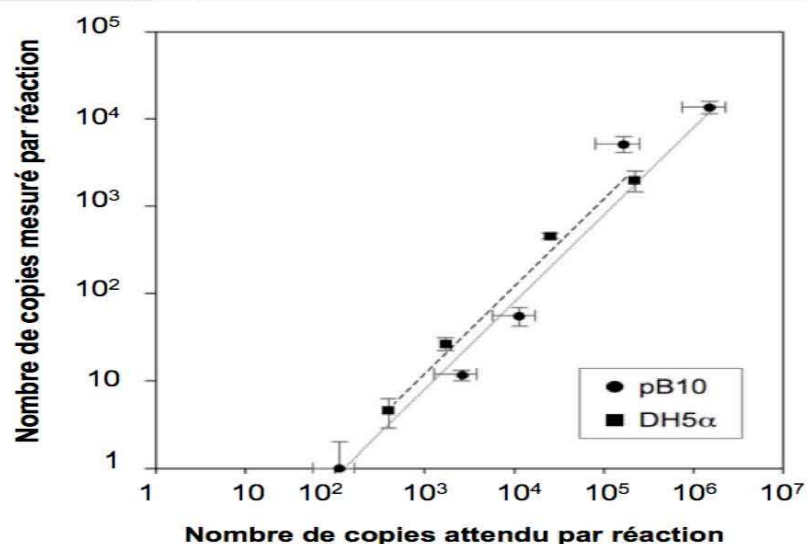


Figure 43 : Sensibilité de la méthode de détection en boues. Les boues ont été inoculées avec des concentrations croissantes de DH5α/pB10. L'ADN extrait a été analysé par q-PCR pour la détection spécifique de DH5α et pB10. On considère qu'une bactérie peut contenir de 5 à 15 copies du plasmide. Le nombre moyen retenu est de 7 copies de pB10/cellule. Les barres d'erreurs horizontales représentent les valeurs minimales et maximales de copies de plasmides attendues. Les barres d'erreur verticales représentent les écarts-types des nombres de copies réellement mesurés. Pour ce qui est de DH5α on considère une copie de génome par cellule. Les barres d'erreur verticales correspondent aux écarts-types des nombres de copies réellement détectés.

Afin de vérifier s'il existe une variation liée à la matrice, d'autres microcosmes (dont les caractéristiques sont décrites dans le chapitre « Matériel et Méthodes ») ont été élaborés avec différentes matrices environnementales (boues biologiques, boues de digesteur anaérobie, procédé d'épuration avec biomasse fixée sur supports, sédiments de rivière et dont les caractéristiques sont décrites dans le chapitre « Matériel et Méthodes »). Ces matrices ont été inoculées avec une même quantité de DH5α/pB10 égale à $2,9 \cdot 10^9$ UFC/ 800 mL. L'analyse a été réalisée comme précédemment développé. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 44-A, 44-B. Globalement, les essais effectués permettent de voir que le nombre de copies détecté est toujours inférieur à celui réellement présent dans l'échantillon avec toutefois un meilleur rendement pour pB10 que pour DH5α. Quelle que soit la matrice considérée et son origine, le pourcentage de copies de génome de DH5α détecté reste cependant de même ordre de grandeur variant entre 1 et 0,1 %. Quant au pourcentage de plasmide détecté, il varie de 0,3 à 54 % selon le type de matrice considéré. Néanmoins même si il existe une grande variation de la détection, le pourcentage de pB10 détecté reste de même ordre de grandeur selon le type de matrice considéré, de l'ordre de 3,5 - 4,5 % dans les boues biologiques. Une variabilité plus importante est observée dans les sédiments avec un nombre de plasmides détecté variant de 10 à 54 %. Pour les essais effectués sur des boues de digesteur anaérobie et

sur procédé à biomasse fixée, on détecte 0,3 à 1,6 % de la quantité attendue dans le prélèvement.

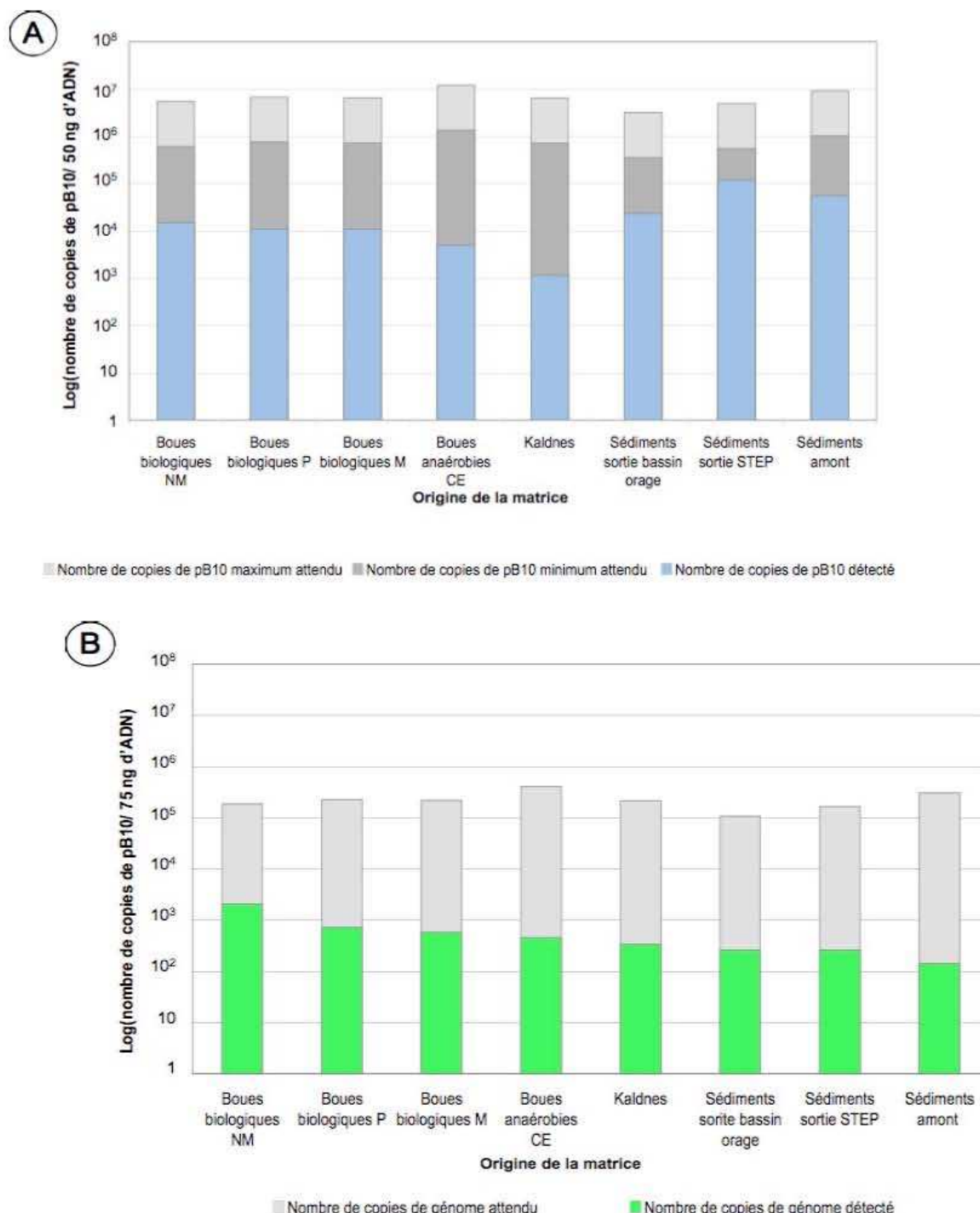


Figure 44 : Détection de pB10 (A) et DH5α (B) après inoculation d'échantillons environnementaux par DH5α/pB10 et extraction d'ADN immédiate par la méthode Porteous modifiée. Le nombre moyen de copies de pB10 attendu est calculé sur la base d'un nombre de plasmides variant de 5 à 15 copies par cellule. NM : STEP de Neuves-Maisons ; P : STEP de Plaisir ; M : STEP de Maurepas ; CE : STEP de Corbeil Essonne.

Ces différences peuvent trouver plusieurs origines. Tout d'abord si l'on considère pB10, la différence observée selon la matrice considérée peut être expliquée par le fait d'interactions avec la matrice. Dans les boues, de nombreuses interactions avec les composants de la matrice sont possibles et les ADN libérés pourraient être retenus. A cela s'ajoute le fait que le plasmide contenu dans sa donneuse nécessite la lyse de la donneuse afin d'être libéré et donc extrait. Dans les boues, la bactérie pourrait être plus protégée vis-à-vis de la lyse au moment de l'extraction de l'ADN. Ces phénomènes pourraient être encore plus marqués dans les boues anaérobies où la boue est dense. Dans le cas des essais menés sur biomasse fixée sur support, le plus faible rendement pourrait trouver son origine dans l'organisation en biofilm qui protège les cellules. En revanche, dans les sédiments, la structure moins complexe de la matrice rend plus accessible les bactéries pour la lyse et l'extraction de l'ADN d'où un rendement plus important. Concernant l'ADN de DH5 α , quelque soit la matrice considérée, le nombre de copies détecté varie de 0,1 à 0,7 % de la dose de bactéries initialement inoculée. Dans ce cas, la taille importante du génome le rend plus vulnérable à la dégradation lors de l'extraction. Une autre hypothèse pourrait être envisagée pour les sédiments. La forte concentration en silice dans les échantillons fait que l'ADN chromosomique libéré pourrait être en interaction avec la matrice. Typiquement lors de l'extraction d'ADN par kit, les ADN sont retenus dans des colonnes composées de silice par des interactions entre les deux. Ceci pourrait avoir lieu dans notre cas pour les échantillons de sédiments et dans ce cas la fraction d'ADN extraite s'en trouve réduite. Le plasmide pB10 étant de plus petite taille, ce type d'interactions se trouve limité et pourrait donc expliquer un rendement d'extraction plus important. Si la sensibilité de la méthode s'avère variable d'une matrice à l'autre, il est intéressant de déterminer si le rapport du nombre de pB10 détecté par rapport au nombre de DH5 α détecté est similaire pour un type de matrice considéré afin de pouvoir comparer les résultats entre eux (figure 45). Les rapports observés sont variables pour un type de matrice considéré par rapport à un autre. Cependant ces rapports sont de même ordre de grandeur pour des matrices de même type ce qui permet donc de pouvoir comparer les résultats entre eux pour un même type de matrice.

Cependant, les données quantitatives obtenues par q-PCR restent comparables dans la mesure où elles concernent une même séquence cible, extraite de milieux similaires, et amplifiée dans les mêmes conditions. Ceci car les taux de disparition/apparition de l'ADN cible ne concernent pas des quantités absolues d'ADN, mais l'évolution de ces quantités. Ces taux peuvent être obtenus indépendamment des cibles ADN, des différents types d'environnements, et comparés entre eux sans que les fluctuations de rendements d'extraction de l'ADN n'interfèrent.

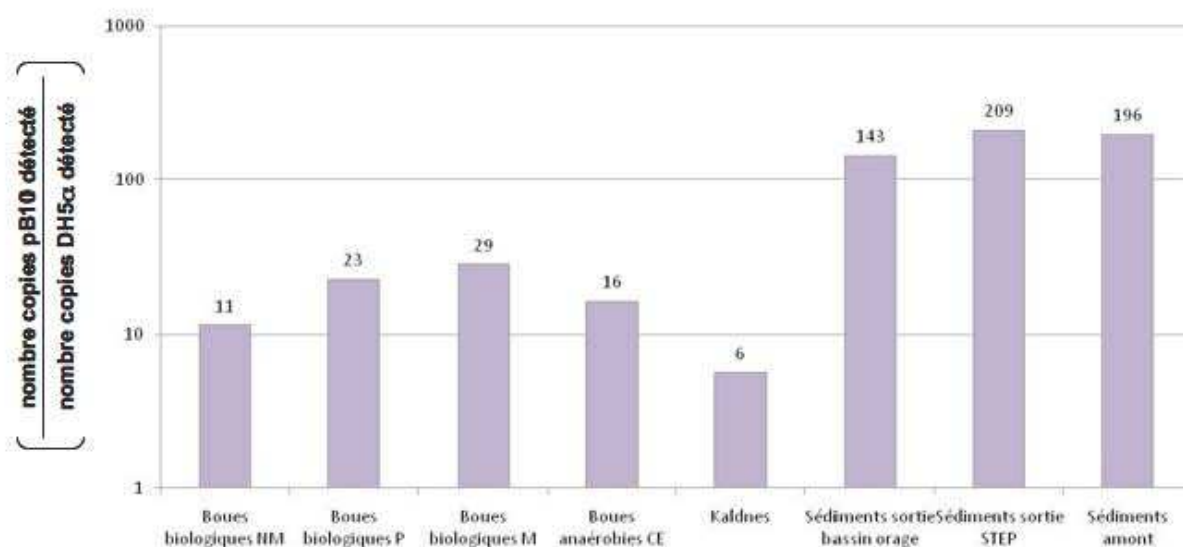


Figure 45 : Effet de la nature de la matrice environnementale sur le ratio pB10 et son hôte où NM : STEP de Neuves-Maisons ; P : STEP de Plaisir ; M : STEP de Maurepas ; CE : STEP de Corbeil Essonne .

Pour résumer cette partie, l'ensemble des résultats est synthétisé dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Récapitulatif des limites de détection de pB10 et DH5α par q-PCR

Limites de détection	Echantillon utilisé	Copies par réaction de 50 µL	Normalisation à 1 µg d'ADN
Détection de pB10:			(× 20)
Limite expérimentale (microcosme) ^a	50 ng d'ADN totaux environnementaux	10 copies	200 copies / µg
Limite expérimentale (ADN pur) ^b	Dilutions d'ADN pur de pB10	1 copie	20 copies / µg
Limite théorique ^c		1 copie	20 copies / µg
Détection de DH5α:			(× 13)
Limite expérimentale (microcosme) ^a	75 ng d'ADN totaux environnementaux	100 copies	1300 copies / µg
Limite expérimentale (ADN pure) ^b	Dilutions d'ADN pur de DH5α	15 copies	195 copies / µg
Limite théorique ^c		1 copie	13 copies / µg

a. La "limite expérimentale (microcosme)" a été obtenue par inoculation des microcosmes de boues avec des quantités connues de cultures de DH5α/pB10 et extraction immédiate de l'ADN d'un échantillon de matrice prélevé. La limite a été définie comme étant l'inoculum le plus petit pour lequel un signal proportionnel à la concentration initial était détectable en q-PCR. Au delà de cette limite, le signal n'est plus considéré comme représentatif de la quantité réelle et est considéré comme nul.

b. La "limite expérimentale (ADN pur)" correspond à la dilution la plus basse d'ADN cible pur produisant un signal détectable par q-PCR.

c. La "limite théorique" correspond à la limite si toute copie de l'ADN cible présente était détectable par q-PCR.

7. Quelle concentration de DH5 α /pB10 apporter initialement dans les microcosmes ?

Afin de pouvoir réaliser les essais en microcosmes, il était nécessaire de définir la taille de l'inoculum bactérien à apporter dans le système. La concentration en bactéries donneuses initiale devait répondre au compromis suivant : ne pas être trop importante afin de ne pas apporter une trop forte concentration de bactéries tout en étant suffisante afin d'être détectable et que l'on puisse suivre une décroissance si elle devait avoir lieu. Il a donc été choisi selon les résultats obtenus dans le paragraphe 6 (Figure 43) d'apporter 2.10^8 UFC de DH5 α /pB10 par microcosme (800mL).

III. Persistance et dissémination du plasmide pB10 dans des matrices environnementales

La détection spécifique et sensible de DH5 α /pB10 par q-PCR étant désormais mise au point, des expériences étaient envisageables afin d'estimer la stabilité et le transfert du plasmide dans des matrices environnementales. Pour cela des expérimentations ont été menées en microcosmes sur des biomasses (boues) issues de station d'épuration d'eaux usées urbaines et sur des sédiments de rivière. Elles ont eu pour but de déterminer l'incidence des paramètres suivants sur la stabilité et le transfert de pB10 :

- Origines des boues biologiques issues de différents procédés dits à boues activées
- Oxygénation et brassage des boues
- Concentration en antibiotiques ajoutée dans les boues
- Influence des procédés d'épuration de STEP
- Influence d'autres matrices environnementales comme des sédiments de rivière

En bref, les essais en laboratoire ont consisté en des microcosmes inoculés avec DH5 α /pB10 et des prélèvements ont été réalisés à intervalles de temps réguliers. L'ADN total a été extrait et analysé par q-PCR. La première étape a consisté à développer un système de microcosmes permettant de maintenir les différentes matrices testées dans des conditions stables sur plusieurs jours. Au cours de la seconde étape, les microcosmes étant vérifiés, nous nous sommes intéressés aux effets de différents paramètres sur le transfert de pB10 dans les communautés microbiennes. Après avoir étudié l'influence de phénomènes physiques comme l'oxygénation et le brassage, sur la stabilité du plasmide pB10, nos investigations se sont orientées sur d'autres paramètres comme l'influence de certains antibiotiques couramment rencontrés dans

les boues de STEP et largement utilisés en médecine humaine: amoxicilline et sulfaméthoxazole.

Dans tous les cas la dissémination de pB10 dans les communautés bactériennes a été exprimée comme sur la mesure différentielle de la quantité d'ADN de la bactérie hôte initiale (DH5 α) et de son plasmide (pB10) dans les microcosmes. Dans le cas d'un transfert de gènes la proportion de pB10 doit augmenter par rapport à celle de son hôte. Dans le cas d'un transfert vertical (augmentation du nombre de copies de pB10 due à la division de la population de bactéries donneuses) la proportion de plasmides et DH5 α doit rester stable.

1. De la nécessaire vérification de la capacité à mesurer le devenir du nombre de copies d'un plasmide en matrice environnementale

Le suivi de pB10 et de sa donneuse dans les matrices environnementales était conditionné par la capacité de maintien des échantillons environnementaux dans des conditions stables sur une période de plusieurs jours. Dans ce but, un système simple de microcosme a été développé au laboratoire consistant en un flacon Schott où les matrices environnementales étaient agitées et aérées grâce à un bullage par air comprimé (systèmes décrits dans le chapitre « Matériels et Méthodes »). Alternativement, les boues biologiques de Neuves-Maisons ont été maintenues également dans des conditions non brassées non oxygénées.

Concernant les boues biologiques, différents paramètres clés ont été définis avec les experts du CIRSEE et chaque boue prélevée devait répondre à ces critères de qualité afin de pouvoir être utilisée pour l'étude. L'ensemble de ces critères retenus est résumé dans le tableau XX suivant.

Tableau XX : Paramètres et valeurs définies comme critères de qualité des boues

	[O ₂] dissous (mg.L ⁻¹)	Volume de sédimentation en 30 minutes V30 (mL.L ⁻¹)	Matières sèches en suspension MES (g.L ⁻¹)	Matières volatiles en suspension MVS (g.L ⁻¹)	Indice de boues IB (mL.g ⁻¹)
Valeurs définies	2- 4	100 - 300	3 - 4	50 à 70% des MES	80 - 150

L'ensemble des boues prélevées et utilisées pour l'étude répondaient à ces critères de qualité (*cf.* chapitre « Matériels et Méthodes »). Ainsi, pour le maintien de ces boues en laboratoire, c'est la concentration en oxygène dissous qui devait rester dans une gamme de valeurs variant entre 2 et 4 mg.L⁻¹. Parallèlement, l'apport d'éléments nutritifs (Nutrient Broth), sensé mimer

les apports en carbone des eaux usées pouvant avoir une incidence sur l'activité biologique, le pH a été suivi afin de vérifier la stabilité des matrices environnementales sur plusieurs jours en laboratoire. Une première série de microcosmes de boues biologiques prélevées à Neuves-Maisons a montré que l'apport du Nutrient Broth en un seul amendement par jour dans le milieu engendrait des modifications importantes du pH, de plus de 2 unités dans certains cas (données non présentées). Le fractionnement de l'apport en deux amendements à 12 h d'intervalles a permis de diminuer les fluctuations de pH, ne variant plus que dans un intervalle compris entre 8 et 6,5.

La durée sur laquelle la stabilité des boues pouvait être assurée a ensuite été estimée. Pour cela, 3 séries de 6 microcosmes aérés et brassés et de 3 microcosmes non aérés non brassés ont été réalisés en maintenant des boues biologiques (prélevées à Neuves-Maisons) préalablement dispersées par mixage au laboratoire. L'évolution du pH et de l'oxygène dissous d'un échantillon représentatif de ces montages sont résumés sur la Figure 46. On observe que pour l'ensemble des microcosmes aérés et brassés, la concentration en oxygène dissous reste comprise entre 2 et 4 mg.L⁻¹ jusqu'à 120 h avec une augmentation de la concentration dans le milieu puis une baisse progressive. Au-delà, la concentration en oxygène dissous diminue et devient inférieure à 2 mg.L⁻¹ dans la plupart des microcosmes. Dans les microcosmes non aérés non brassés la concentration en oxygène dissous diminue dans les premières 48 h et reste ensuite stable proche de 0,2 mg.L⁻¹.

Concernant le pH, on observe une variation de ce dernier entre 6,5 et 8. De façon générale, après 120 h le pH chute dans tous les microcosmes jusqu'à devenir inférieur à 6. Cette baisse de plus d'une unité de pH peut traduire une modification trop importante pour que l'on puisse poursuivre les essais au-delà de 144 h. Par conséquent, dans le but de rester dans des conditions moins variables, la durée maximale des essais a été fixée à 120 h.

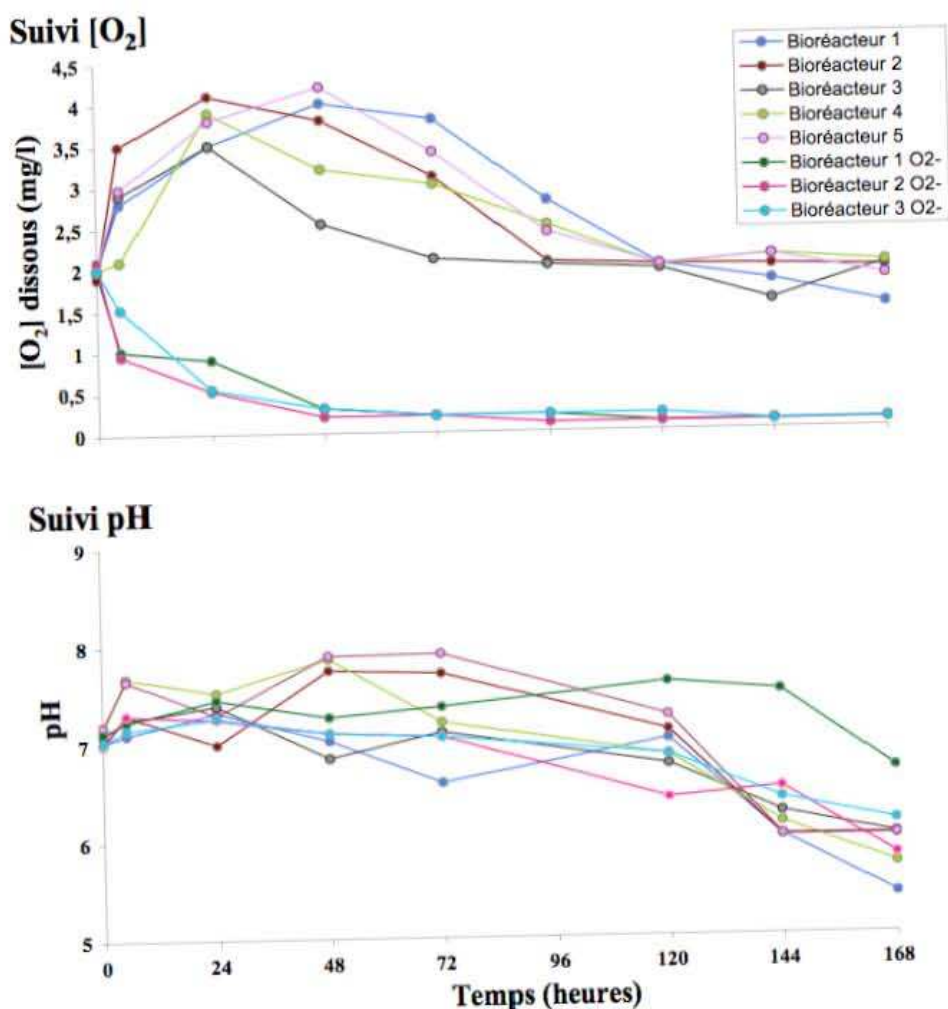


Figure 46 : Exemple type de l'évolution du pH et de [O₂] dissous dans des microcosmes test de boues biologiques. Les résultats présentés ont été obtenus en maintenant des boues biologiques prélevées à la STEP de Neuves-Maisons en microcosmes. Les boues biologiques des bioréacteurs 1 à 6 sont maintenues dans des conditions aérées brassées ; les boues biologiques des bioréacteurs « 1 O₂- » à « 3 O₂- » ont été maintenues dans des conditions non aérées non brassées.

L'évolution du pH et de la concentration en O₂ dissous a été suivie pour chaque matrice environnementale utilisée et maintenue en microcosmes au laboratoire. Pour chaque boue biologique d'origine différente des résultats représentatifs des mesures obtenues sont présentés sur les figures 47, 48 et 49.

Boues biologiques STEP Neuves Maisons

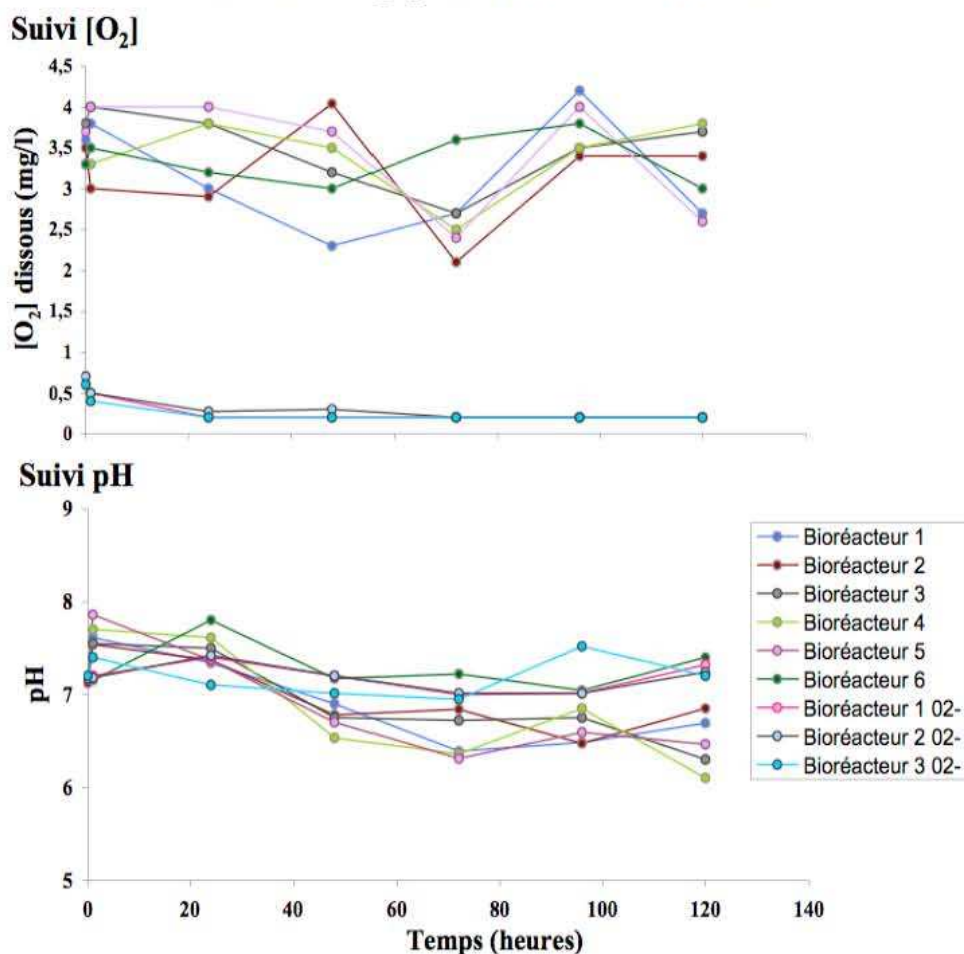


Figure 47 : Exemple type de l'évolution du pH et de [O₂] dissous dans des microcosmes de boues de Neuves-Maisons. Les résultats présentés ont été obtenus au cours de différentes campagnes : bioréacteurs 1, 2 et «1 O₂-» : boues biologiques prélevées le 03/04/08 ; bioréacteurs 3, 4 et «2 O₂-» : boues biologiques prélevées le 30/06/08 ; bioréacteurs 5, 6 et «3 O₂-» : boues biologiques prélevées le 09/06/09. Les boues biologiques des bioréacteurs 1 à 6 sont maintenues dans des conditions aérées brassées ; les boues biologiques des bioréacteurs «1 O₂-» à «3 O₂-» ont été maintenues dans des conditions non aérées non brassées.

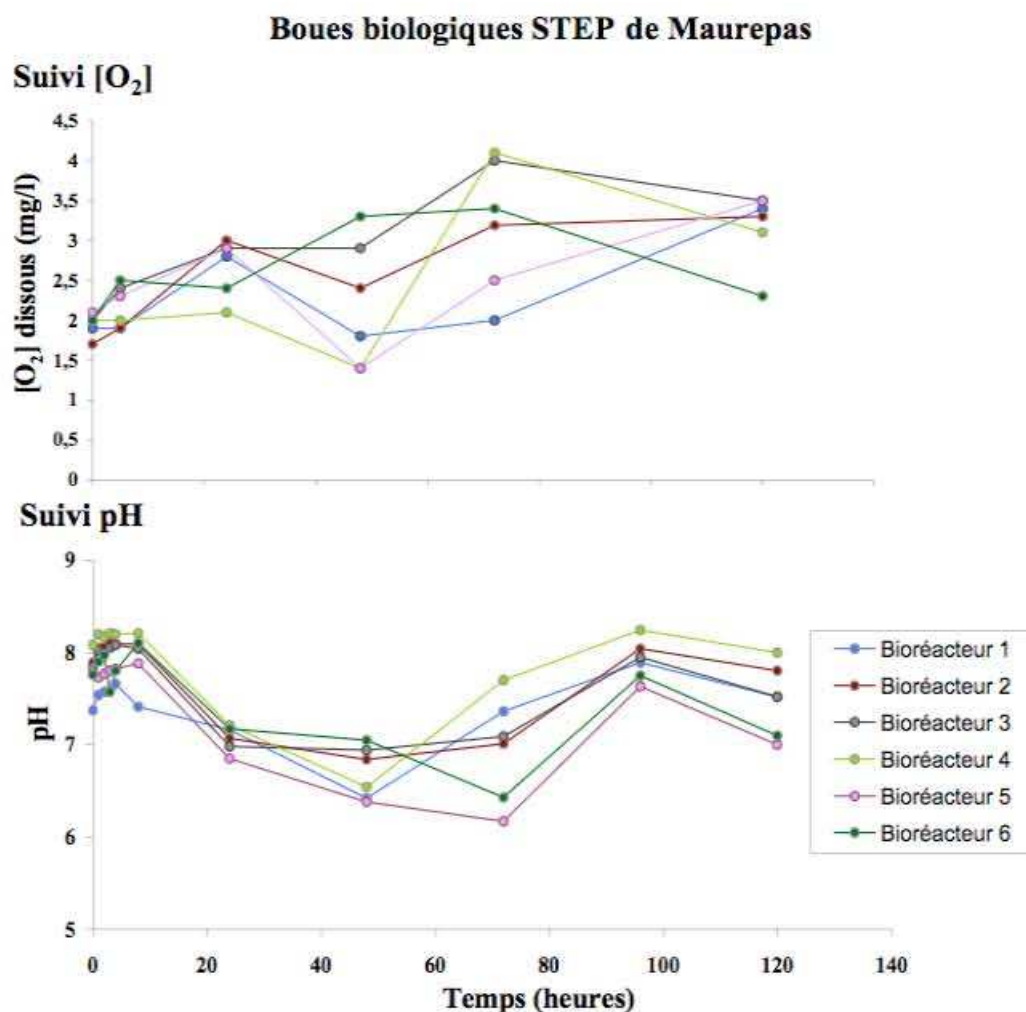


Figure 48 : Exemple type de l'évolution du pH et de [O₂] dissous dans des microcosmes de boues de Maurepas. Les résultats présentés ont été obtenus au cours de différents campagnes : bioréacteurs 1 et 2 : boues biologiques prélevées le 03/10/08 ; bioréacteurs 3 et 4 : boues biologiques prélevées le 10/10/08 ; bioréacteurs 5 et 6 : boues biologiques prélevées le 23/10/08. Les boues biologiques ont été maintenues dans des conditions aérées brassées.

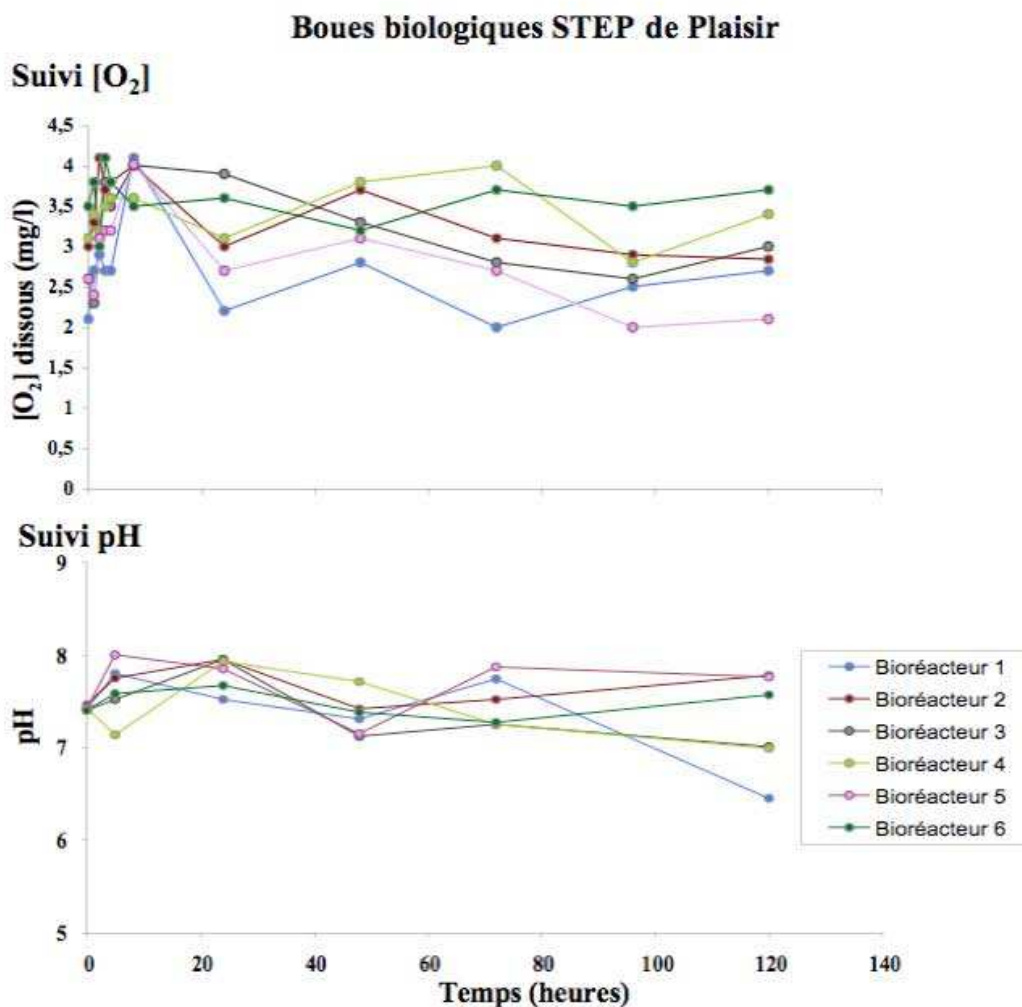


Figure 49 : Exemple type de l'évolution du pH et de $[O_2]$ dissous dans des microcosmes de boues de Plaisir. Les résultats présentés ont été obtenus au cours de différentes campagnes : bioréacteurs 1 et 2 : boues biologiques prélevées le 03/10/08 ; bioréacteurs 3 et 4 : boues biologiques prélevées le 10/10/08 ; bioréacteurs 5 et 6 : boues biologiques prélevées le 23/10/08. Les boues biologiques ont été maintenues dans des conditions aérées brassées.

Pour l'ensemble des boues biologiques testées, provenant des 3 STEP, les résultats de mesures obtenus montrent que l'on a pu maintenir les matrices dans des conditions semblables, relativement stables vis-à-vis des critères fixés quant à la $[O_2]$ dissous qui est restée comprise entre 2 et 4 $mg.L^{-1}$. Les fluctuations observées sont en partie dues aux fluctuations dans le débit d'air général servant à alimenter les microcosmes. Grâce à ce système, le pH a pu être maintenu dans une gamme variant de 6,5 à 8. Cela traduit une stabilité apparente qui ne peut cependant pas assurer de l'absence de modifications physico-chimiques et biologiques. Les résultats laissent seulement sous-entendre que ces modifications se trouvent limitées grâce à ce système et l'intervalle de temps court sur lequel nous travaillons.

D'autres matrices environnementales ont été maintenues dans des conditions de pH et $[O_2]$ dissous stables par ce système. Il s'agit d'un procédé d'épuration à biomasse fixée sur des disques de polyéthylène (procédé Kaldnes) (figure 50) (dont les détails sont présentés dans le

chapitre « Matériels et Méthodes ») et de sédiments de rivières (figure 51). Dans ces deux cas, on observe une stabilité encore plus marquée des deux paramètres mesurés, la $[O_2]$ dissous variant entre 2,5 et 4 $mg.L^{-1}$ et le pH entre 7 et 8 pour les microcosmes élaborés à partir de disques de polyéthylène colonisés Kaldnes.

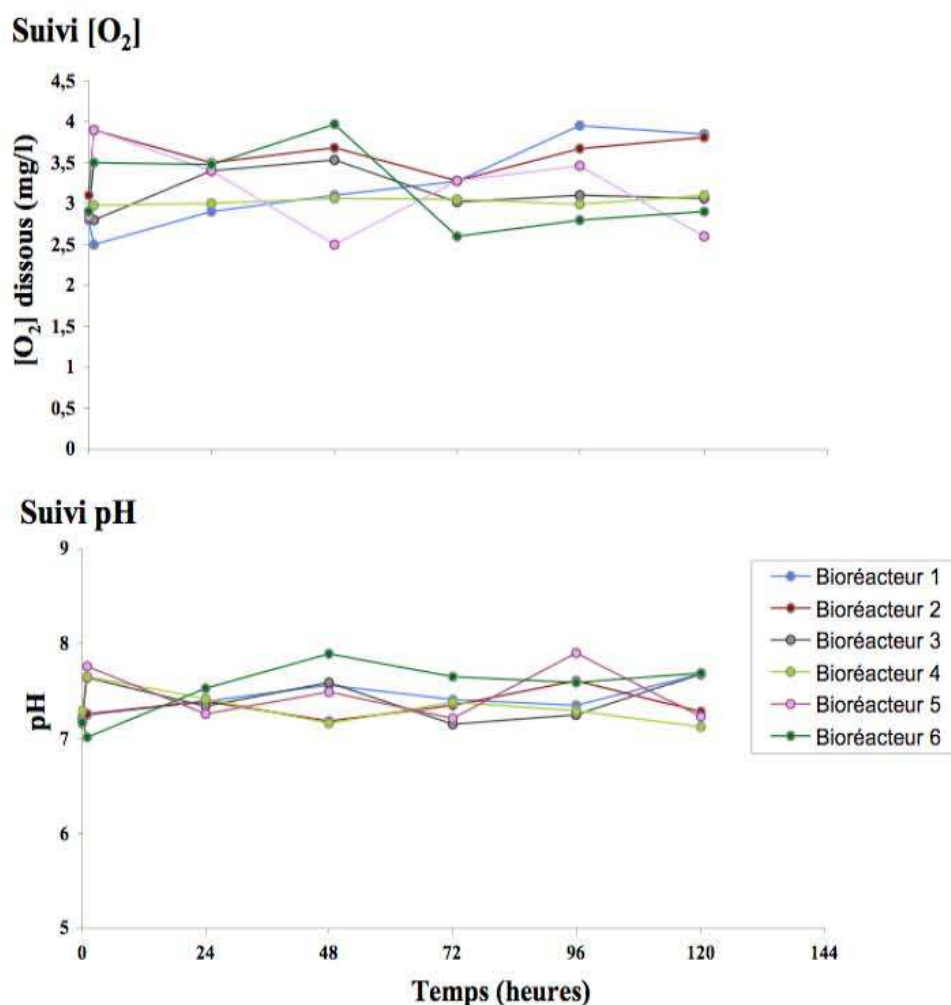


Figure 50 : Exemple type de l'évolution du pH et de $[O_2]$ dissous dans des microcosmes de biofilms sur disques de polyéthylène Kaldnes. Les résultats présentés ont été obtenus sur des bioréacteurs maintenus dans des conditions aérées brassées.

Pour les microcosmes de sédiments, le pH reste stable proche de 6,5 pendant tout l'essai et les concentrations en $[O_2]$ dissous varient là encore entre 2 et 4 $mg.L^{-1}$.

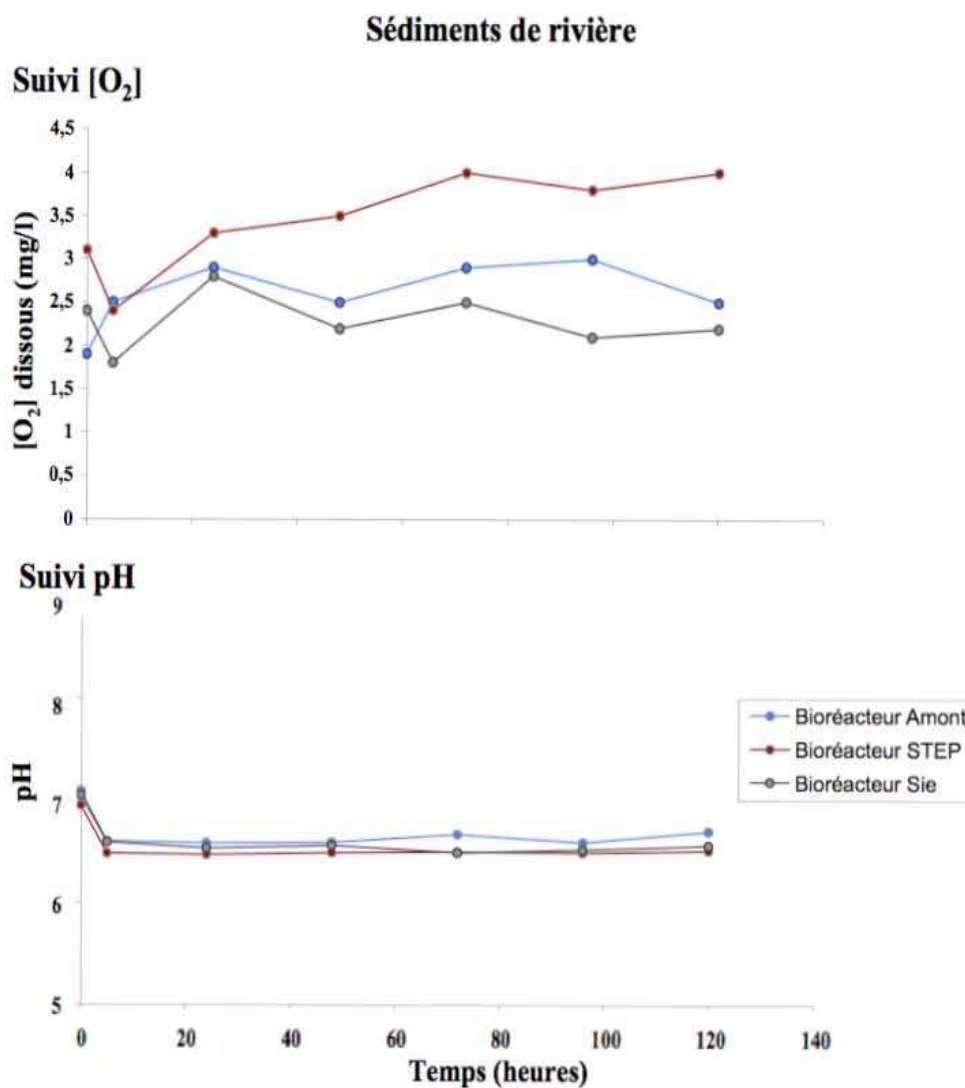


Figure 51 : Exemple type de l'évolution du pH et de [O₂] dissous dans des microcosmes de sédiments de la rivière Moselle. Les résultats présentés ont été obtenus sur des bioréacteurs de sédiments prélevés le 04/03/09 au niveau de 3 sites différents et qui ont été maintenus dans des conditions aérées brassées.

Le maintien des boues anaérobies a nécessité un autre système (dont les caractéristiques sont détaillées dans le chapitre « Matériels et Méthodes »). Succinctement, le montage a consisté à placer les boues dans un flacon serum, serti après avoir créé une anaérobie totale par bullage des boues à l'azote. Les microcosmes ont été maintenus à 37°C en étuve thermostatée pendant 10 jours. Un seul paramètre a pu être suivi : il s'agit de la production de gaz journalière estimée par pesées différentielles avant et après dégazage des systèmes. L'objectif était de vérifier que la production de gaz était constante tout au long de l'essai. La production de gaz journalière est présentée sur la figure 52. Après une baisse au cours des premières 24 h, la production de gaz fluctue dans un intervalle compris entre 0,4 et 0,5 g.j⁻¹ pour les bioréacteurs 1 et 2 et compris entre 0,3 et 0,4 g.j⁻¹ pour le bioréacteur 3. Au dixième jour, la production de gaz diminue de façon plus marquée pour les bioréacteurs 1 et 2. Ainsi, la production de gaz est relativement

constante pour l'ensemble de la durée de l'essai et caractérise de fait une activité biologique relativement stable au cours de notre essai pendant 9 jours.

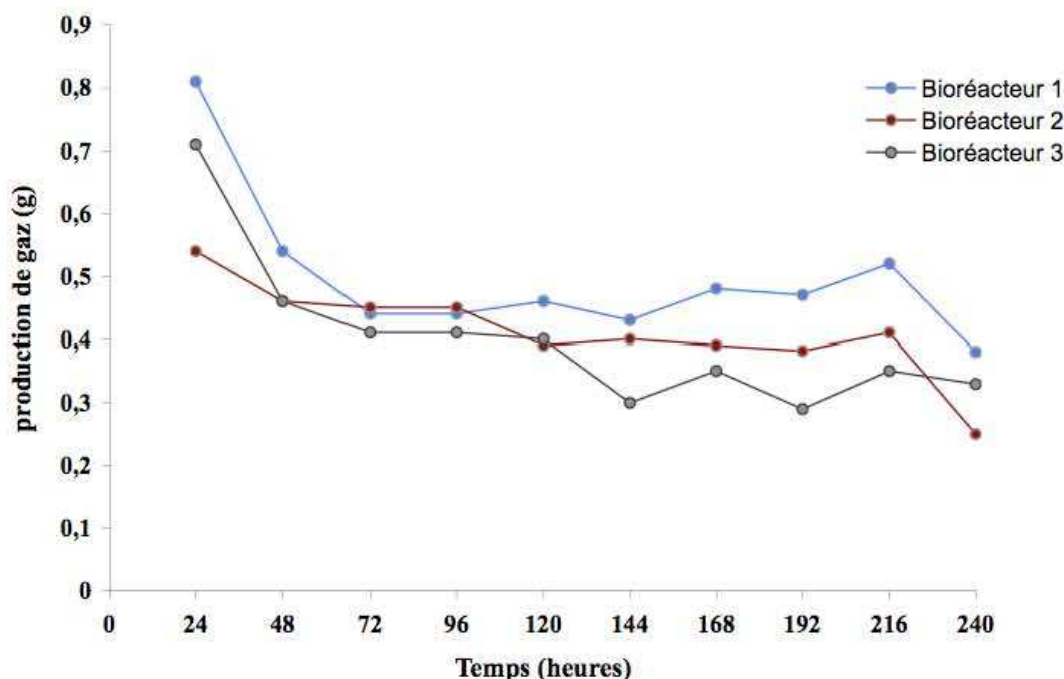


Figure 52 : Exemple type de l'évolution de la production de gaz dans des microcosmes de boues de digesteur anaérobie maintenues dans des conditions anaérobies.

En conclusion, l'évolution des paramètres pH et de $[O_2]$ dissous dans les différents microcosmes élaborés pour l'expérimentation a montré que dans tous les essais réalisés, nous avons pu répondre aux critères fixés. Ainsi, ces systèmes de microcosmes ont été retenus pour réaliser nos essais de devenir de pB10 dans des matrices environnementales.

2. Incidence de l'origine des boues biologiques issues de différentes stations d'épuration dites à boues activées, sur la stabilité et le transfert de pB10

L'influence de la matrice environnementale, et par conséquent des communautés microbiennes qu'elle héberge et de ses caractéristiques physico-chimiques, a été étudiée en menant 3 expériences en parallèle où seule l'origine « géographique » de la boue a été changée. Les boues biologiques ont été prélevées dans trois stations d'épuration différentes : Neuves-Maisons (Lorraine), Plaisir et Maurepas (Région parisienne) dont les caractéristiques physico-chimiques sont décrites dans le chapitre « Matériels et Méthodes ». La composition des boues pouvant varier dans le temps, les expérimentations ont été répétées sur trois prélèvements effectués à raison d'une semaine d'intervalle. En pratique, les boues prélevées dans les 3 STEP ont été maintenues en conditions stables de brassage et oxygène en laboratoire durant 5 jours. Ces boues ont été inoculées avec des cultures de DH5 α /pB10 à raison de $21 \cdot 10^7$

UFC/microcosmes (800 mL). 50 mL de boues ont été prélevés dans les microcosmes toutes les 24 h pour mesurer le pH et la concentration en O₂ dissous et en extraire l'ADN total. L'évolution du nombre de pB10 et du nombre de copies de génome de DH5α détecté par q-PCR est présentée sur la figure 53.

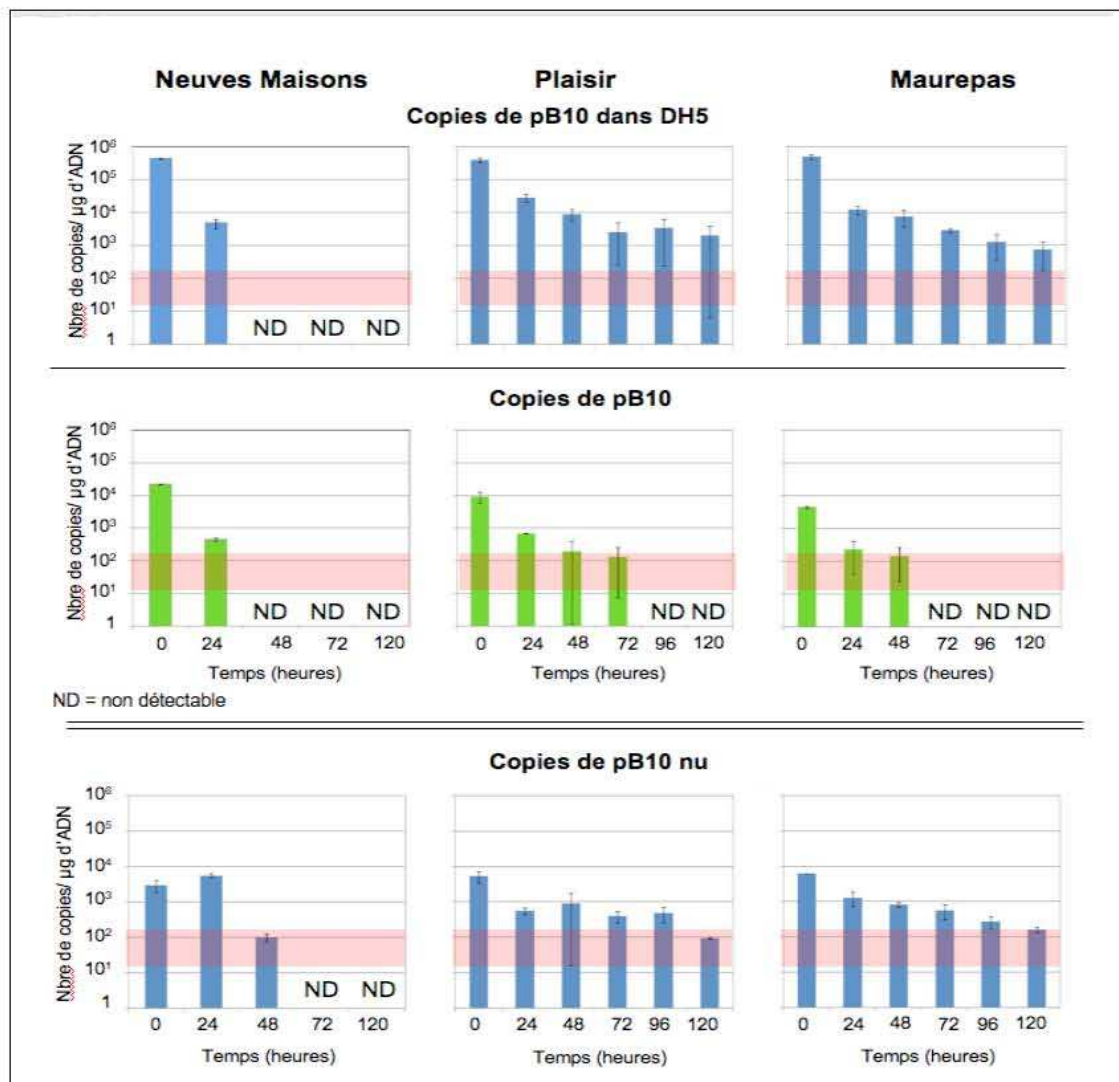


Figure 53 : Incidence de l'origine de la boue biologique sur la stabilité et le transfert de pB10. Chaque point représente une moyenne de 9 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en PCR pour les 3 microcosmes). La barre d'erreur correspond à l'écart-type calculé à partir des 3 moyennes obtenues pour les 3 microcosmes. La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été considérés comme des artefacts et considérés comme nuls. Ils sont notés ND : non détectable.

Les résultats montrent, de façon générale, une diminution du nombre de copies de pB10 au cours du temps dans les trois boues biologiques avec toutefois quelques nuances selon la boue considérée. En effet, la perte de pB10 semble suivre une même cinétique dans les boues prélevées à Plaisir et Maurepas où l'on note des diminutions respectives de 2 log et 2,5 log de la concentration sur la durée de l'expérience avec un ralentissement sur les 3 derniers jours. Dans

les boues provenant de la STEP de Neuves-Maisons, la disparition du plasmide est plus prononcée avec une perte d'environ 5 log en moins de 2 jours.

Cette différence peut trouver plusieurs explications. Il est à noter, que d'autres essais réalisés un an après à partir des boues biologiques prélevées à Neuves-Maisons montrent un profil différent (Figure 54). En effet, les essais réalisés en juin 2009 montrent une disparition plus lente de pB10 et DH5 α dans les boues. Le nombre de copies de pB10 diminue d'un log environ par 24 h et devient non détectable à partir de 96 h cette fois. Il en est de même pour DH5 α qui reste détectable jusqu'à 72 h.

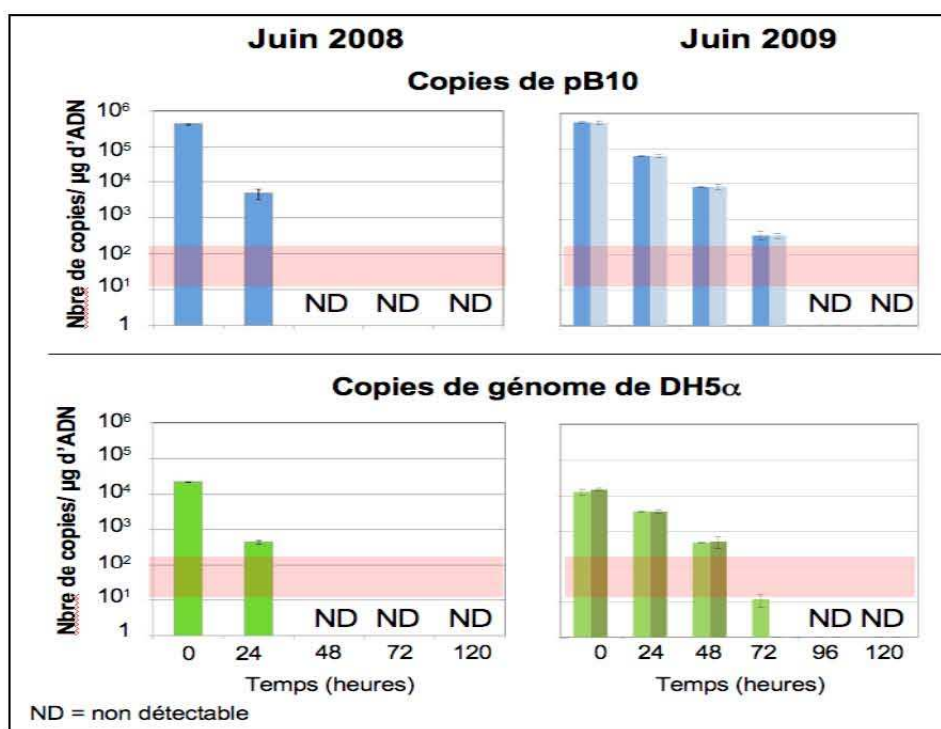


Figure 54 : Incidence de l'origine de la boue biologique sur la stabilité et le transfert de pB10 pour l'essai de juin 2009. Chaque point représente une moyenne de 9 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en PCR pour les 3 microcosmes). La barre d'erreur correspond à l'écart-type calculé à partir des 3 moyennes obtenues pour les 3 microcosmes. La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été considérés comme des artefacts et considérés comme nuls. Ils sont notés ND : non détectable.

Pour des raisons pratiques, les différents essais menés sur les boues de Maurepas et Plaisir ont été réalisés aux laboratoires du CIRSEE (Le Pecq, Yvelines) et ceux menés sur les boues de Neuves-Maisons l'ont été au LCPME (Vandoeuvre lès Nancy, Meurthe et Moselle). La totalité du matériel utilisé et le mode opératoire furent strictement les mêmes dans les deux cas. Considérant une variation de profil identique pour des boues issues d'une même STEP et des conditions expérimentales semblables pour tous les microcosmes, on peut supposer que les

différences observées dans la disparition de DH5 α /pB10 soient liées en particulier aux différentes caractéristiques physico-chimiques de chacune des boues, sans toutefois pouvoir déterminer lesquelles à partir des données physico-chimiques dont nous disposons.

Si l'on revient à l'essai comparatif entre les boues issues des différentes STEP (figure 53), concernant l'évolution du nombre de copies de génome de DH5 α , les mêmes tendances que celles de pB10 sont observées. Néanmoins il est difficile de pouvoir établir si la vitesse de disparition de DH5 α est similaire à celle de pB10 car le nombre de copies détecté passe rapidement dans la zone d'incertitude et sous le seuil de détection. Dans les boues des stations Plaisir et Maurepas le nombre de pB10 reste élevé même en fin d'expérimentation. Cette observation pourrait résulter d'une résurgence de séquences homologues aux séquences cibles de DH5 α et pB10 présents initialement dans les boues à des concentrations inférieures au seuil de détection en PCR. Afin de vérifier cette possibilité, pour chaque matrice testée, des essais sans inoculum de plasmide et de bactéries donneuses ont été maintenus dans les mêmes conditions et analysés en PCR quantitative. Pour l'ensemble des essais présentés dans cette étude, aucun signal n'a été détecté dans les matrices originelles au cours de la durée des essais. Ces résultats montrent qu'il est possible de suivre spécifiquement un élément génétique mobile dans une matrice environnementale complexe sans avoir recours aux techniques classiques de microbiologie basées sur la culture et générant des biais considérables. C'est finalement l'écologie d'une population bactérienne et plasmidique *in situ* qui devient directement possible.

A la lumière de ces premières expériences, il apparaît que pB10 ne se maintient pas dans les boues sur de longues périodes. Néanmoins, avant de conclure à une perte systématique du plasmide il était nécessaire de vérifier différentes hypothèses.

(i) Premièrement, cette diminution pouvait-elle être due à des inhibiteurs contenus dans les échantillons d'ADN qui interfèrent sur l'analyse. En effet, lors de l'extraction de l'ADN dans les échantillons de boues, des molécules co-extraites avec l'ADN peuvent inhiber la réaction de PCR. Afin de s'en assurer, pour chaque ensemble d'échantillons testés en q-PCR, des échantillons ont été pris au hasard et inoculés avec des concentrations en pB10 et DH5 α connues afin de servir de témoins d'inhibition. Il en a été de même pour les échantillons où aucun signal de fluorescence n'était mesuré, ceci afin de pouvoir déterminer s'il s'agit d'un effet inhibiteur de l'extrait d'ADN ou d'une absence de plasmide et de bactérie donneuse dans l'extrait. Pour tous les échantillons testés aucun effet inhibiteur n'a été observé.

(ii) L'hypothèse d'inhibiteurs co-extraits étant écartée, la disparition de DH5 α et de pB10 pouvait-elle s'expliquer par exemple par une lyse des bactéries donneuses, peu adaptées aux conditions environnementales des boues. Il s'en suivrait une dégradation enzymatique et/ou chimique des ADN chromosomiques et plasmidiques dans les boues. Afin de déterminer la stabilité du plasmide pB10 dans les boues dans le cas d'une libération due à la lyse cellulaire de la bactérie donneuse, les mêmes expérimentations ont été menées avec pour inoculum initial de l'ADN plasmidique à une concentration de $1,25 \cdot 10^5$ copies de pB10/mL de boues. Les résultats sont présentés sur la figure 53. Pour les 3 boues considérées, on observe comme précédemment une perte du plasmide pB10 dans le temps. Néanmoins cette perte est moins marquée que lorsque pB10 est apporté dans une bactérie. Le plasmide apparaît donc moins stable lorsqu'il est contenu dans une bactérie donneuse que lorsqu'il est apporté dans les boues sous forme plasmide nu. Ceci laisse donc penser que la perte de pB10 dans les boues n'est pas simplement due à une lyse bactérienne.

(iii) Cette disparition pourrait aussi être imputée à la prédation des bactéries donneuses par les protozoaires présents dans les boues. À cet égard, des observations en microscopie optique ont montré qu'au bout de 48 h les populations de protozoaires, largement amoindries lors de l'homogénéisation des boues par mixage en début d'expérience, sont à nouveau très importantes dans les microcosmes.

En résumé nos résultats montrent qu'en conditions aérobies, quelle que soit l'origine des boues biologiques, on observe une perte du plasmide et de la bactérie donneuse dans les communautés bactériennes. Cependant la perte de la bactérie donneuse et du plasmide est variable selon l'origine de la boue. Aussi, pour limiter cet effet « origine des boues », l'ensemble des autres expérimentations sur boues biologiques ont toutes été réalisées avec des boues prélevées à la STEP de Neuves-Maisons.

3. Les conditions non aérées non brassées stabilisent DH5 α /pB10 dans les boues biologiques

Dans le bassin biologique d'une STEP, les boues sont aérées par microbullage et ce système assure en même temps un brassage des boues. La dissémination des plasmides étant régie par un contact intercellulaire, le brassage pourrait limiter leur transfert. A contrario, l'absence d'aération des boues évitant le brassage mécanique mais privant l'écosystème de di-oxygène, pourrait avoir une incidence sur le transfert. Dans le bassin biologique d'une station d'épuration, aération et brassage étant indissociables, nous avons voulu en laboratoire estimer

l'impact de ces deux paramètres sur le transfert de pB10. Des essais en microcosmes avec des boues biologiques prélevées à Neuves-Maisons ont été réalisés. Ces boues ont été inoculées avec des cultures de DH5 α /pB10 (à raison de $2,5 \cdot 10^5$ UFC/mL de boues) ou de l'ADN plasmidique ($1,25 \cdot 10^5$ copies/mL de boues). Les boues ont été maintenues en laboratoire durant 5 jours dans des conditions stables d'oxygénation et de brassage pour une part d'entre elles. L'autre partie des boues a été maintenue sans brassage, ni oxygénation. Des volumes de 50 mL de boues ont été prélevés dans les microcosmes toutes les 24h et l'ADN total extrait puis analysé en q-PCR. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 55.

Comme précédemment, le nombre de copies de pB10 diminue au cours du temps dans les boues. Néanmoins, la perte est beaucoup plus marquée dans les boues maintenues dans des conditions aérées brassées. En effet, la concentration de pB10 diminue de 2 log en 24 h et plus aucune copie du plasmide n'est détectable au bout de 48 h. Dans les boues non aérées non brassées, le nombre de pB10 diminue progressivement de 2 log au cours de l'essai et reste détectable au bout de 120 h. Le nombre de bactéries donneuses diminue de la même façon que pB10 mais, comme précédemment, la vitesse de décroissance n'est pas calculable du fait que l'on se trouve rapidement dans la zone d'incertitude de détection. Les essais menés avec de l'ADN plasmidique nu dans le système montrent un profil différent pour les boues aérées brassées par rapport aux essais où pB10 est apporté dans DH5 α . Dans les essais non brassés non oxygénés en revanche, le profil de disparition de pB10 au cours du temps paraît similaire dans les deux cas (nu ou contenu dans une bactérie donneuse). Cette observation ne permet cependant pas de conclure à une lyse bactérienne.

Les observations visuelles des boues non oxygénées non brassées montrent une modification de l'aspect de l'échantillon au cours du temps qui indiquent une modification des conditions physico-chimiques et biologiques des boues. Les observations en microscopie optique ont pu montrer que la structure en floc est totalement modifiée laissant place à un environnement avec des bactéries sous forme planctonique ou en microagrégats. De plus les mêmes observations microscopiques montrent que les populations de protozoaires restent limitées au cours du temps dans les boues non oxygénées non brassées, ce qui limiterait le phénomène de prédation.

Ces résultats suggèrent donc que l'oxygénation et le brassage des boues limitent le maintien de pB10 dans les communautés bactériennes des boues. La prédation par les protozoaires présents dans les boues pourrait expliquer cette diminution du plasmide due à la disparition des bactéries donneuses. Les mouvements engendrés par le brassage pourraient de plus limiter ou empêcher le transfert de pB10 par conjugaison bactérienne.

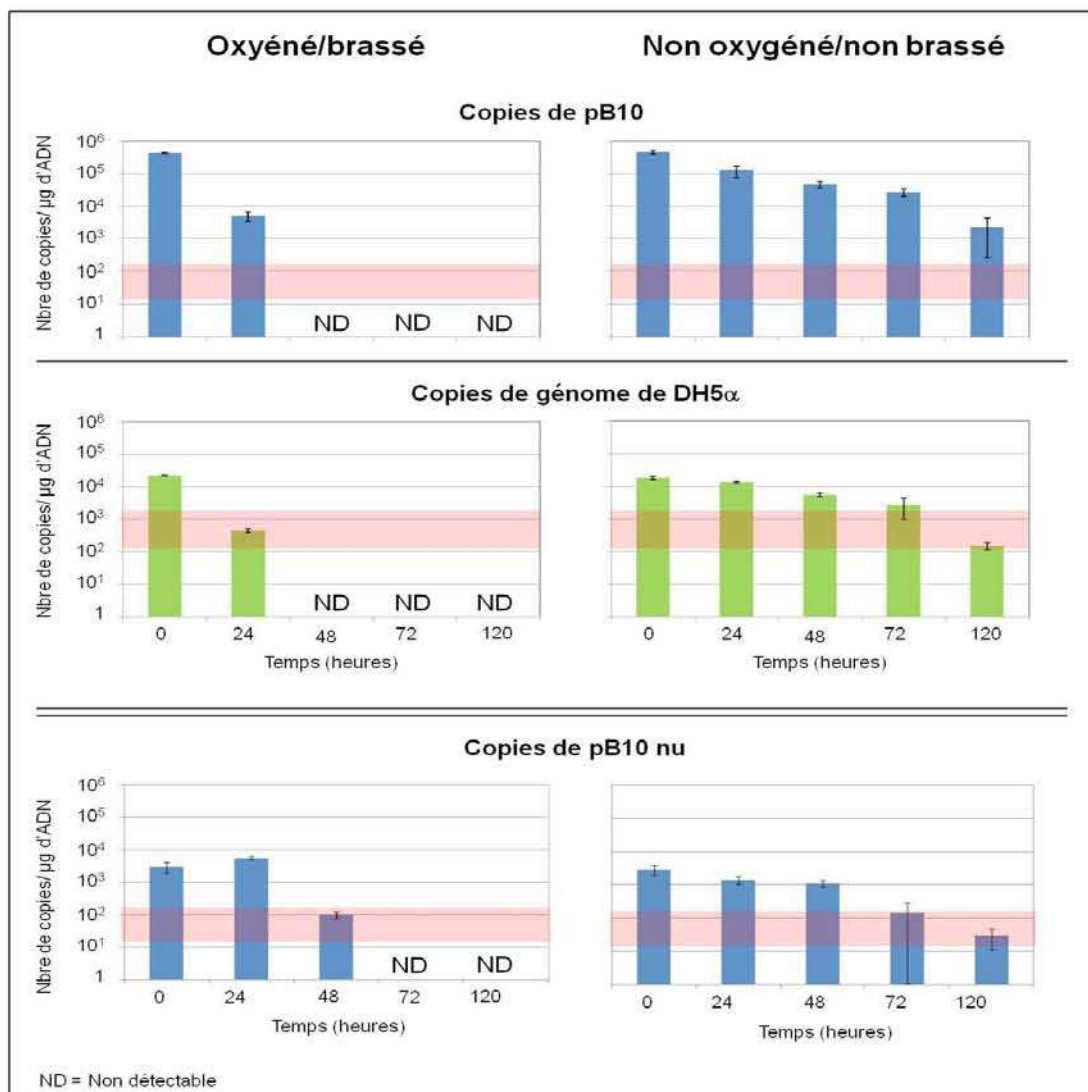


Figure 55 : Influence de l'oxygénation et du brassage des boues sur le devenir de pB10 et DH5 α . Chaque point représente une moyenne de 9 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en PCR pour les 3 microcosmes). La barre d'erreur correspond à l'écart-type calculé à partir des 3 moyennes obtenues pour les 3 microcosmes. La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été considérés comme des artefacts et considérés comme nuls. Ils sont notés ND : non détectable.

4. L'ajout de sulfaméthoxazole et d'amoxicilline stabilise DH5 α /pB10 dans les boues

Les antibiotiques sont connus pour être susceptibles d'induire le transfert d'éléments mobiles type transposons ou plasmides en doses sub-inhibitrices dans des conditions de laboratoire. Leur effet dans l'environnement reste encore mal connu. Les influents d'eaux usées urbaines contiennent des antibiotiques à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$, largement inférieures aux CMI connues des antibiotiques et de ce fait n'ont pas d'effet bactéricide ou bactériostatique sur la majorité des bactéries dans l'environnement.

A ces doses environnementales, on peut alors se demander quels effets ont les antibiotiques sur le transfert de pB10. Les données de la littérature ont déjà mis en évidence ce possible effet. Pour répondre à cette question des microcosmes de boues biologiques ont été inoculés avec DH5 α /pB10 et dans lesquels du sulfaméthoxazole ou de l'amoxicilline ont été ajoutés à deux concentrations : une proche des concentrations en bassin biologique qui ont pu être estimées dans de nombreuses études (1,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le sulfaméthoxazole et 1,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'amoxicilline) et une proche de la CMI la plus basse définie sur des souches bactériennes cultivables (bases de données CITRON faculté de pharmacie de Lille) (12 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le sulfaméthoxazole et l'amoxicilline, respectivement).

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 56, 57, 58 et 59. D'une façon générale ces deux antibiotiques n'induisent pas de transfert du plasmide, si l'on considère en parallèle l'évolution des copies de pB10 et de DH5 α . Par contre l'effet notable des antibiotiques est sensible sur le maintien de DH5 α /pB10 dans le système, en d'autres termes le maintien de la bactérie DH5 α /pB10 sous l'incidence de la pression antibiotique se trouve amélioré. « L'aptitude » de la bactérie à se maintenir dans le milieu augmenterait par le fait qu'elle possède le plasmide et que l'antibiotique est présent.

En effet, dans un premier temps, si l'on considère les évolutions de pB10 dans les boues amendées ou non en sulfaméthoxazole, on observe dans toutes les boues une diminution d'environ 1,5 log au bout de 24 h. Dans les boues où l'antibiotique a été ajouté, le plasmide reste détectable à 48 h à 20 et 50 copies/ μg d'ADN. Pour la plus importante concentration en sulfaméthoxazole (12 $\mu\text{g.L}^{-1}$), le plasmide reste encore détectable au bout de 72 h. Parallèlement, l'évolution de DH5 α suit la même tendance. Aussi c'est un maintien de DH5 α /pB10 dans le milieu sous l'effet de la pression antibiotique qui est observé.

Dans les mêmes conditions, les résultats obtenus avec des inoculums de pB10 nu montrent la même tendance avec une stabilité plus importante lorsque du sulfaméthoxazole a été ajouté dans le milieu. A une concentration de 12 $\mu\text{g/L}$ de sulfaméthoxazole le plasmide reste détectable dans le milieu à la fin de l'essai de l'ordre de 100 copies/ μg d'ADN. Si l'ADN persiste en présence de sulfaméthoxazole, c'est que la dégradation de l'ADN dans le milieu est ralentie.

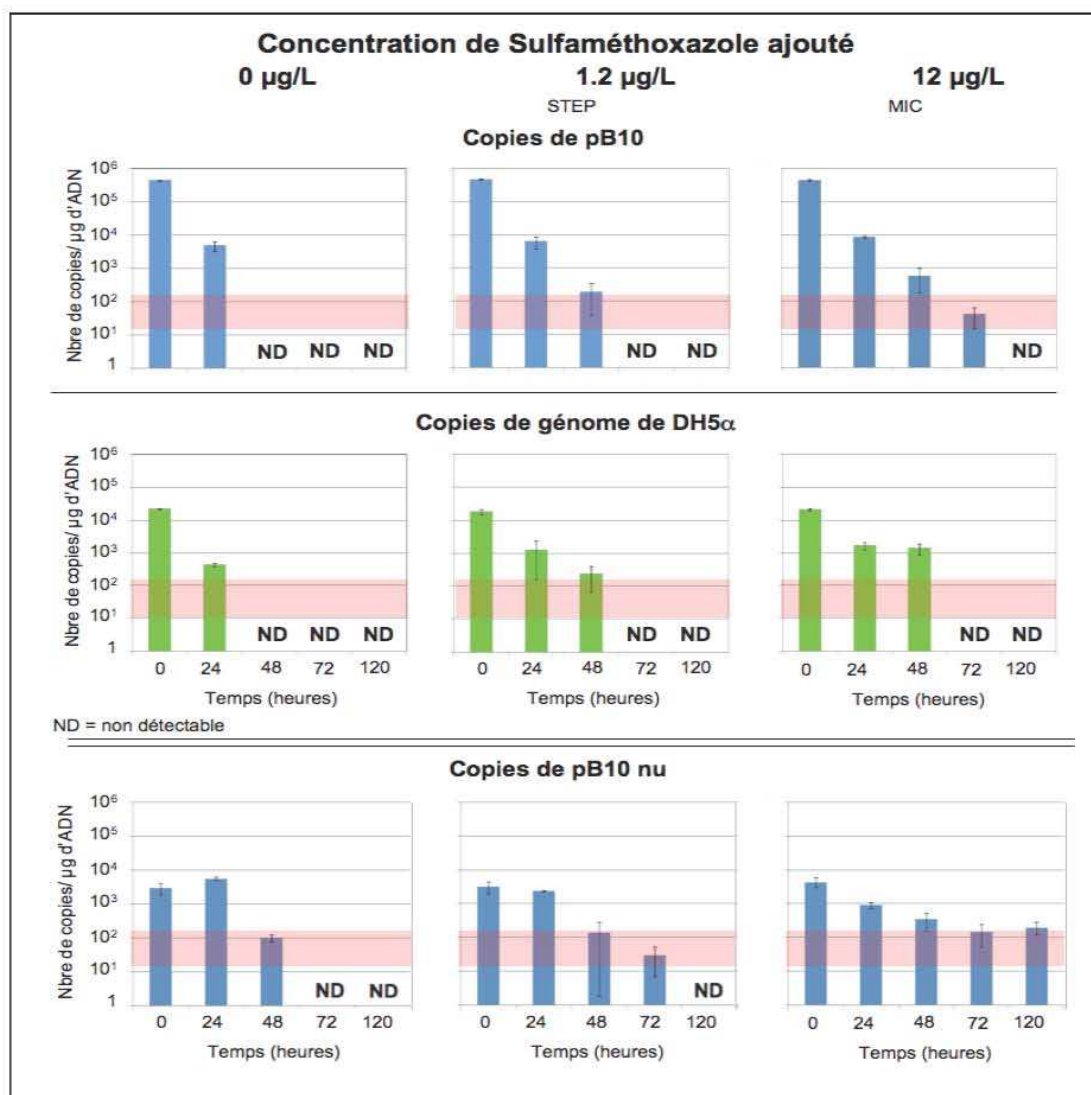


Figure 56 : Influence du sulfaméthoxazole sur la stabilité de pB10 et DH5α dans des microcosmes de boues biologiques aérées brassées. Chaque point représente une moyenne de 9 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en q-PCR pour les 3 microcosmes). La barre d'erreur correspond à l'écart-type calculé à partir des 3 moyennes obtenues pour les 3 microcosmes. La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été considérés comme des artefacts et considérés comme nuls. Ils sont notés ND : non détectable.

Toutefois l'essai témoin sans ajout d'antibiotique dans les boues contient du sulfaméthoxazole. Aucun dosage n'a été réalisé mais la concentration présente est probablement proche de celle ajoutée si l'on se base sur les concentrations traditionnellement dosées en boues et disponibles dans la littérature. Le maintien de pB10 dans les essais témoins est peut-être déjà assujéti à l'influence du sulfaméthoxazole intrinsèque. On a donc un effet additionnel des doses ajoutées et un essai en boues sans sulfaméthoxazole est impossible.

Les mêmes essais ont été réalisés dans des boues non aérées non brassées (Figure 57) et les mêmes observations d'amélioration du maintien de DH5 α /pB10 dans le milieu ont été faites. Dans ce cas, on a un effet du sulfaméthoxazole et des conditions non aérées non brassées des boues. En effet en fin d'expérience, sans addition d'antibiotique, le nombre de copies de pB10 avait diminué de 2 log. En présence du sulfaméthoxazole à 1,2 μ g/L, le nombre de copies avait baissé de 1,5 log. Pour une dose 10 fois plus importante d'antibiotique, la baisse n'est plus que de 0,5 log sur 5 jours. L'évolution de la bactérie donneuse suit la même tendance, c'est par conséquent là encore un maintien de DH5 α /pB10 dans les boues qui explique le maintien de pB10 dans le milieu. L'effet de l'antibiotique et de la présence limitée de prédateurs peut expliquer cette meilleure stabilité.

En ce qui concerne le pB10 nu, il n'y a pas de différence importante selon qu'il y ait ou non de sulfaméthoxazole dans les boues (Figure 57). Dans les 3 cas, la concentration en plasmide diminue lentement et reste détectable en fin d'essai. C'est donc bien ici la stabilité de l'ADN nu face à la dégradation que l'on observe et la présence ou non de sulfaméthoxazole n'a logiquement aucun effet sur ce phénomène.

Dans un second temps, l'effet de l'amoxicilline a été estimé de la même façon. Les résultats obtenus sont résumés sur les figures 58 et 59. En microcosmes aérés brassés en absence d'ajout d'amoxicilline, le nombre de copies de pB10 diminue d'environ 1 log par 24 h et devient non détectable au bout de 96 h. Avec un ajout d'amoxicilline de 1,5 μ g/L le plasmide diminue de 2 log en 48 h puis se stabilise à une concentration de l'ordre de 10^4 copies/ μ g d'ADN jusqu'à la fin de l'essai. Pour une concentration 10 fois plus importante d'antibiotique, pB10 diminue d'environ 1,5 log en 24 h et reste détectable en fin d'essai à une concentration proche de 10^4 copies/ μ g d'ADN. L'évolution du nombre de donneuses suivant la même tendance, ceci traduit là encore un maintien de DH5 α /pB10 dans les boues sous la pression antibiotique. Cependant dans ce cas, si l'amoxicilline améliore le maintien de DH5 α /pB10, la relation dose/effet n'existe pas.

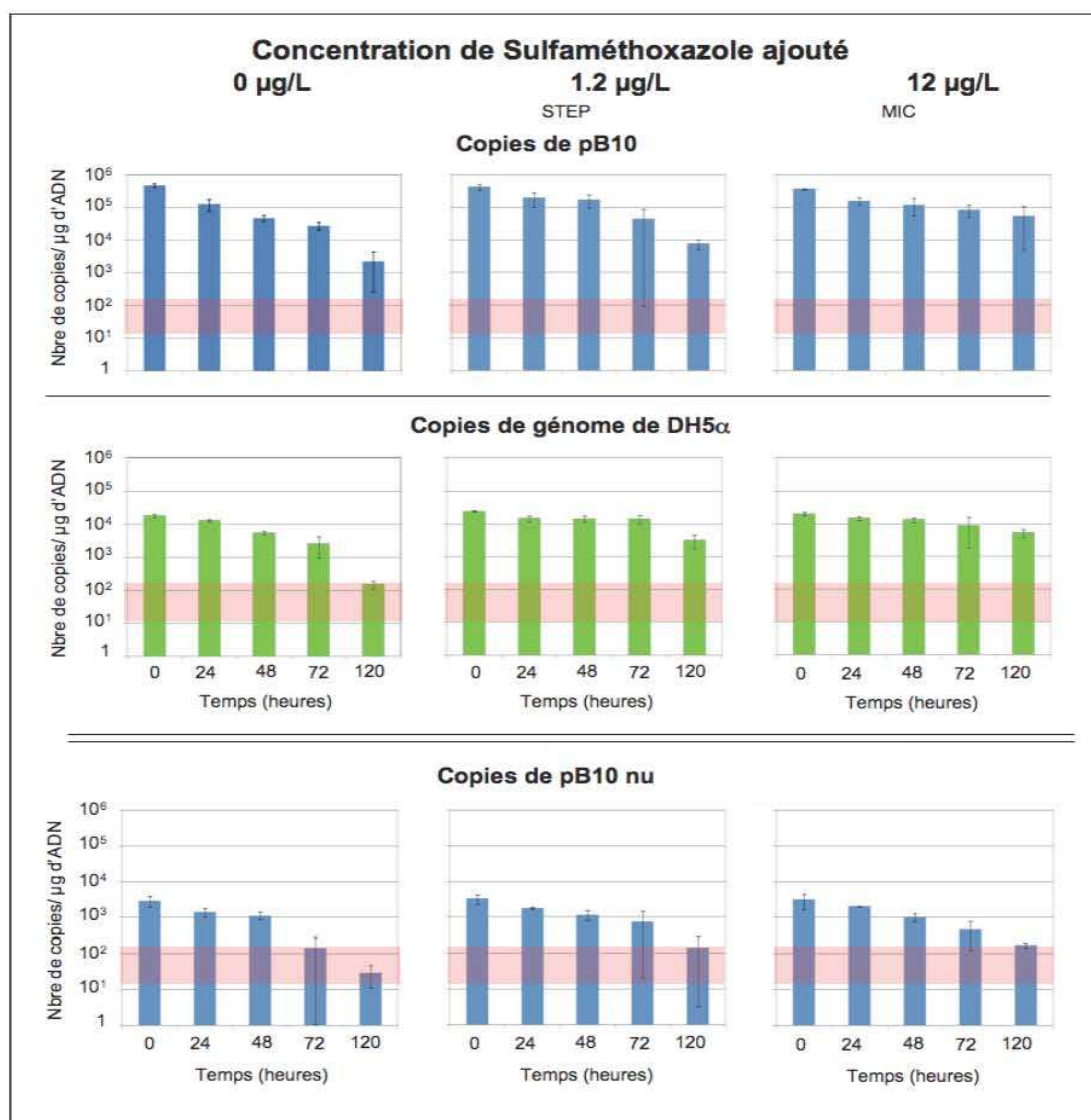


Figure 57 : Influence du sulfaméthoxazole sur la stabilité de pB10 et DH5α dans des microcosmes de boues biologiques non aérées non brassées. Chaque point représente une moyenne de 9 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en PCR pour les 3 microcosmes). La barre d'erreur correspond à l'écart-type calculé à partir des 3 moyennes obtenues pour les 3 microcosmes. La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été considérés comme des artefacts et considérés comme nuls. Ils sont notés ND : non détectable.

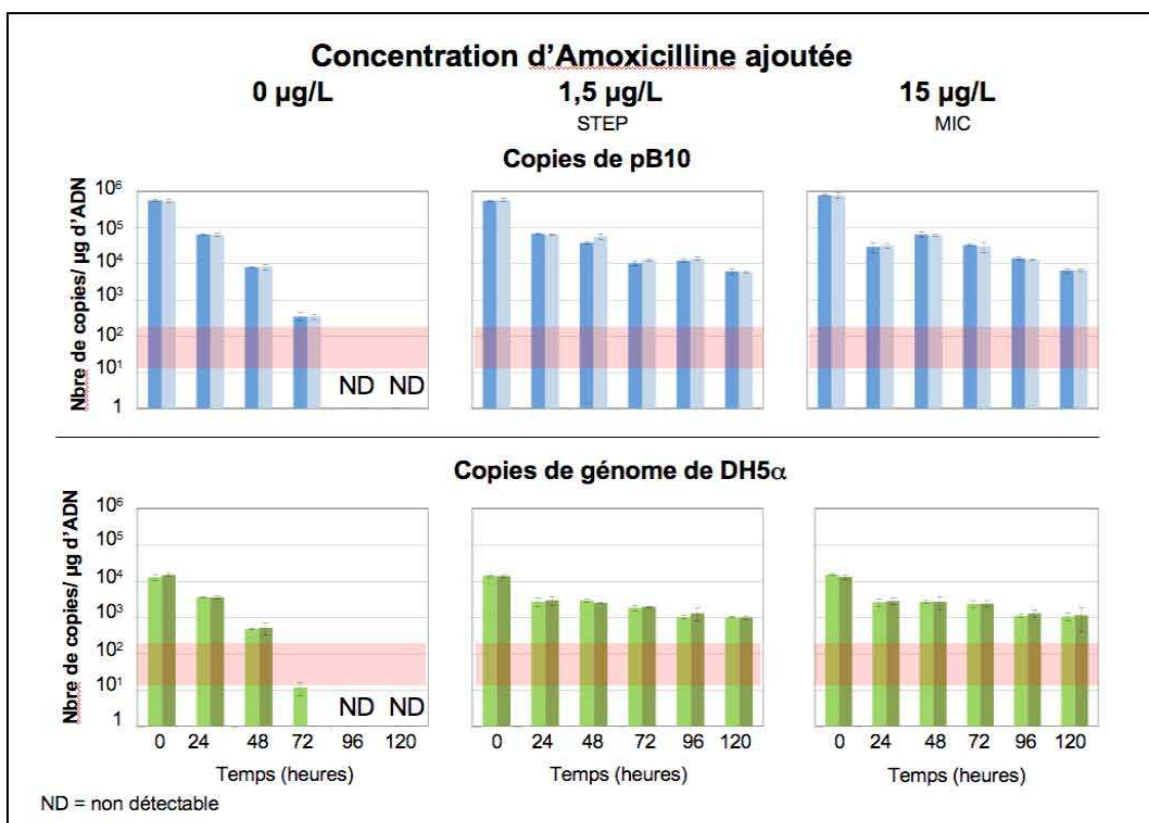


Figure 58 : Influence de l'amoxicilline sur la stabilité de pB10 et DH5α dans des microcosmes de boues biologiques aérées brassées. Chaque point représente une moyenne de 3 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en q-PCR). Les 2 essais sont représentés en deux couleurs différentes. La barre d'erreur correspond à l'écart-type calculé à partir des 3 valeurs obtenues en q-PCR. La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été considérés comme des artefacts et considérés comme nuls. Ils sont notés ND : non détectable.

En conditions non aérées non brassées (figure 59), dans les 3 cas, pB10 reste stable et détectable à 10⁵ copies/µg d'ADN en fin d'essai. Le nombre de bactéries donneuses reste stable tout au long de l'essai proche de 10⁴ copies/µg d'ADN. Cette évolution est par conséquent similaire à celle observée pour pB10 et traduit le maintien de DH5α/pB10 dans le milieu. Dans ce cas précis, on n'observe pas de relation entre la dose d'amoxicilline ajoutée et l'augmentation de l'aptitude à persister des bactéries dans cet environnement. Ceci serait dû au fait d'un masquage de l'effet antibiotique par celui des conditions non aérées non brassées du milieu.

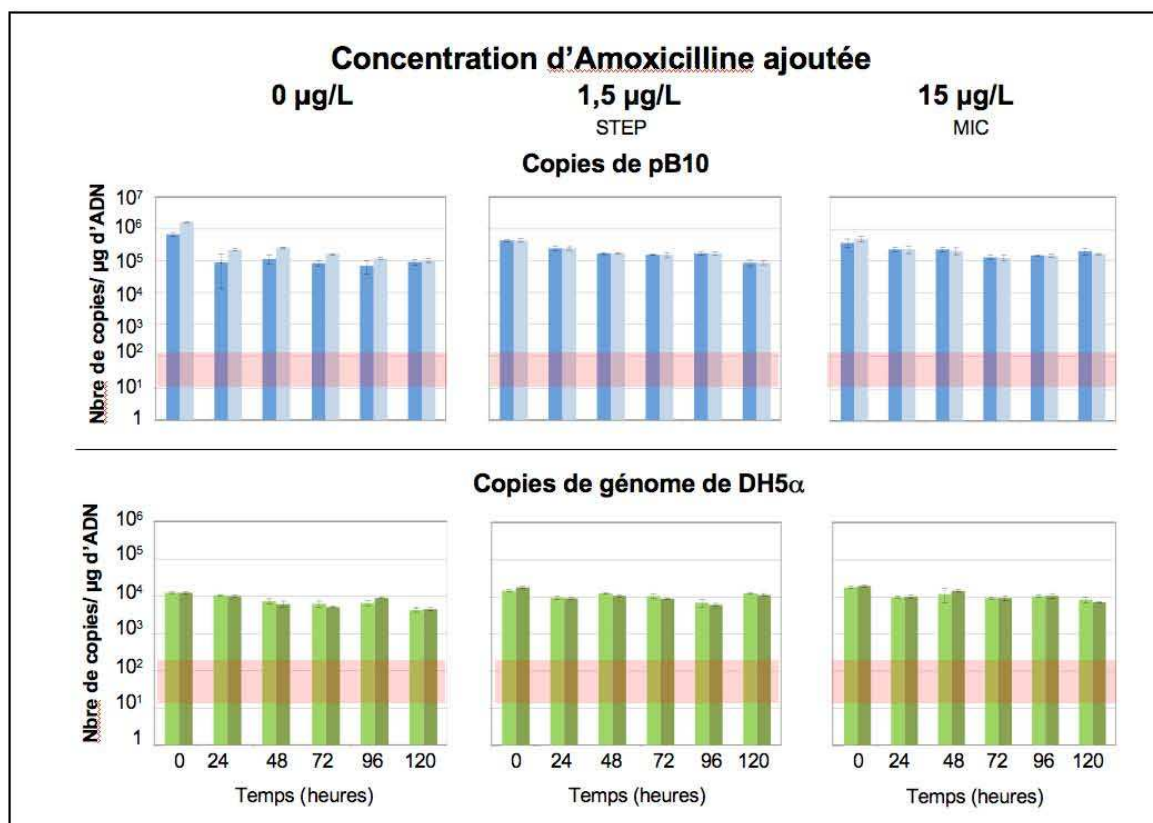


Figure 59 : Influence de l'amoxicilline sur la stabilité de pB10 et DH5α dans des microcosmes de boues biologiques non aérées, non brassées. Chaque point représente une moyenne de 3 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en PCR). Les 2 essais sont représentés en deux couleurs différentes. La barre d'erreur correspond à l'écart-type calculé à partir des 3 valeurs obtenues en q-PCR. La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été considérés comme des artefacts et considérés comme nuls. Ils sont notés ND : non détectable.

5. Procédé kaldnes™ : le biofilm favorise le transfert du plasmide pB10

Traditionnellement le procédé le plus couramment utilisé en bassin biologique est celui des boues activées et nous l'avons vu dans ce cas, il ne semble pas y avoir de transfert de pB10. Mais d'autres procédés d'épuration existent comme les procédés à biomasse fixée de type Kaldnes™ où la biomasse est organisée en biofilm sur des supports de polyéthylène. Ici, nous avons fait l'hypothèse que la forte densité des bactéries dans les biofilms pourrait favoriser les transferts de gènes. Dans ce but, des essais ont été menés avec des disques colonisés de Kaldnes™ collectés dans la STEP de Corbeil-Essonnes et maintenus en microcosmes dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Cependant, chaque microcosme n'a été répété que deux fois et à partir du même prélèvement. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 60.

Les résultats obtenus montrent qu'au cours des premières 24 h le nombre de copies de pB10 diminue d'environ 0,5 log (un artefact dont l'origine n'est pas connu est observé sur l'un des

deux microcosmes). Le nombre de pB10 se stabilise ensuite au cours de l'essai dans des valeurs proches de 8.10^3 copies/ μg d'ADN. Dans le même temps, le nombre de bactéries donneuses diminue de 1,5 log en 48h passant de 5.10^3 à 100 copies/ μg d'ADN. A partir de 72 h les bactéries donneuses deviennent indétectables dans les microcosmes.

Ainsi, le nombre de plasmides reste constant dans le milieu pendant que la bactérie donneuse disparaît. Ces résultats révèlent un transfert du plasmide vers les populations bactériennes indigènes. Pour écarter l'hypothèse d'une rémanence du plasmide liée à une lyse de la bactérie donneuse, des essais menés avec de l'ADN de pB10 nu ont pu montrer que celui-ci ne perdurait pas dans le milieu au cours du temps. En effet, dans le premier essai, le plasmide diminue lentement et reste détectable en fin d'expérimentation. Dans le second essai, le plasmide diminue et devient indétectable au bout de 72 h.

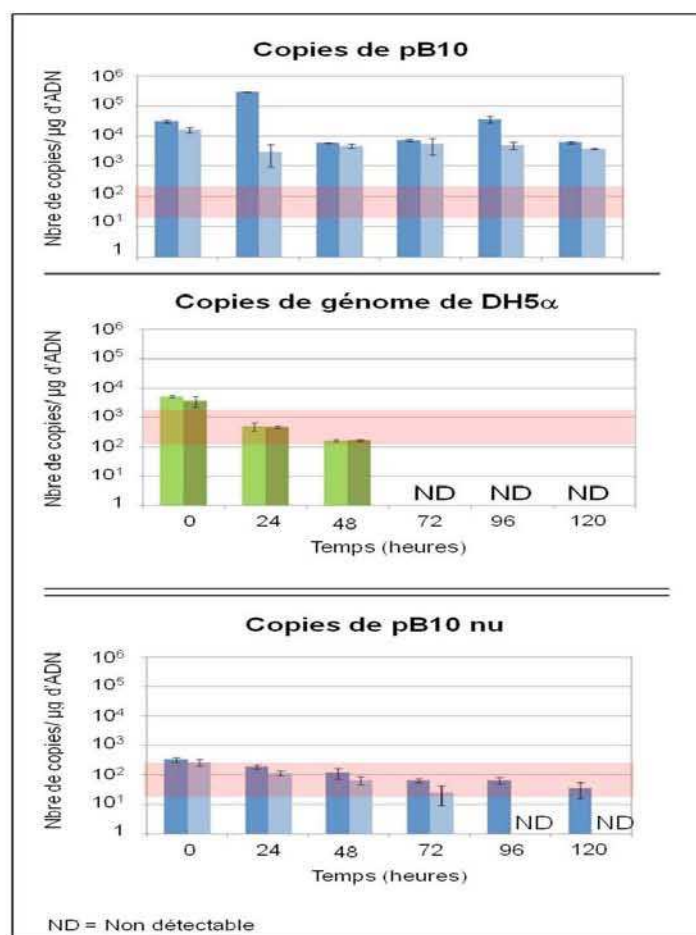


Figure 60 : Influence de l'organisation en biofilm de la biomasse sur la stabilité du plasmide pB10 et de DH5α. Chaque point représente une moyenne de 3 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en q-PCR). Les essais ont été répétés deux fois à partir d'un même prélèvement et chaque couleur d'histogramme correspond à une répétition. La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été assimilés à des artefacts et considérés comme nuls.

6. Les conditions de digesteur anaérobie favorisent le transfert de pB10

Afin de vérifier l'incidence d'autres conditions environnementales sur le transfert de pB10, des essais ont été menés en inoculant des boues de digesteur anaérobie. Ces boues ont été maintenues en anaérobie stricte pendant 10 jours, à une température constante de 37°C. Un témoin réalisé avec des boues activées de bassin aérobie provenant de la même STEP, et maintenues dans les mêmes conditions d'anaérobie, a été réalisé. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 61. Dans les boues biologiques maintenues en conditions anaérobies, le nombre de copies de pB10 diminue régulièrement de 2 log sur 120 heures après quoi il se stabilise à une valeur comprise entre 10^2 et 10^3 copies par μg d'ADN. Dans le même temps, le nombre de donneuses dans les boues diminue également de 2 log sur 120 h. Jusqu'à la fin de l'expérimentation, DH5 α reste détectable mais le nombre de copies détecté se trouve dans la zone d'incertitude de détection. De ce fait il est difficile de tenir compte des fluctuations observées dans cette zone d'un point de vue quantitatif. Le nombre de pB10 diminuant en même temps que celui de la donneuse, nous reconnaissons que dans ce cas il n'y a pas eu transfert de pB10 dans les communautés bactériennes indigènes.

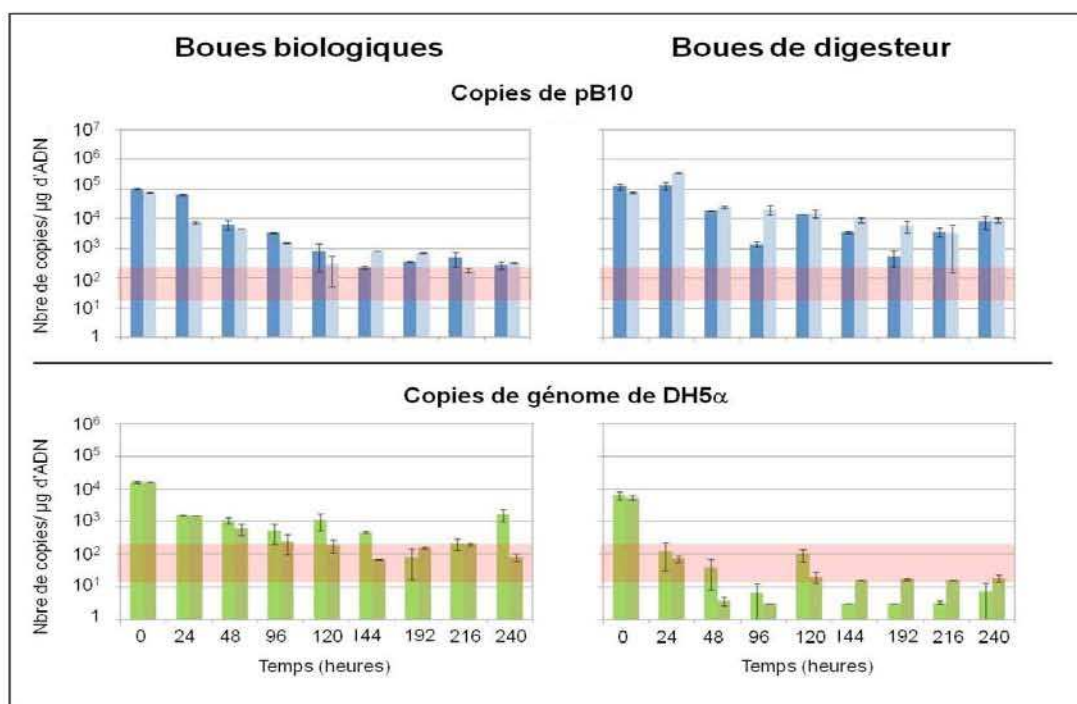


Figure 61 : Influence des conditions de digesteur anaérobie sur la stabilité du plasmide pB10 et de DH5 α . Chaque point représente une moyenne de 3 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en q-PCR). Les essais ont été répétés deux fois à partir d'un même prélèvement et chaque couleur d'histogramme correspond à une répétition. La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été assimilés comme des artefacts et considérés comme nuls.

Pour ce qui est des boues anaérobies, le nombre de copies de pB10 chute de 1 à 2 log (selon l'essai) puis se stabilise à partir de 96 heures. Pour DH5 α , la chute est beaucoup plus marquée d'au moins 3 log en 48 heures seulement. La donneuse disparaissant alors que le plasmide se maintient dans le milieu, il faut reconnaître ici un transfert de pB10 dans les communautés bactériennes indigènes.

Ainsi, le type de biomasse et son environnement (en particulier aérobie *versus* anaérobie) sont susceptibles de favoriser ou au contraire de limiter la stabilité et/ou le transfert d'éléments tels que pB10. En cas de transfert, la dissémination de l'élément pourra éventuellement conduire à son rejet via les effluents de la STEP. Les eaux usées traitées sont rejetées dans la rivière après décantation des boues. Aussi l'apport dans l'environnement de bactéries résistantes pourrait engendrer l'émergence de nouveaux résistants par transfert de pB10. Mais alors quel peut être leur devenir dans d'autres matrices dans l'environnement ? Dans ce but nous avons donc estimé le transfert dans des sédiments de rivières.

7. Et dans l'environnement? Effet de la matrice : Les sédiments de rivière milieux propices au transfert ou au maintien de pB10

L'effet d'une autre matrice environnementale sur le devenir du plasmide pB10 a été étudié avec des sédiments de rivière prélevés dans la Moselle (*cf.* « Matériels et Méthodes »). Les microcosmes ont été maintenus dans des conditions aérées (sans brassage) et inoculés avec DH5 α /pB10 selon la même procédure que celle utilisée et décrite pour les microcosmes de boues biologiques aérobies. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 62.

Deux phénomènes sont observés selon le sédiment considéré: une stabilité de DH5 α /pB10 dans le milieu dans un cas et un transfert de pB10 dans les deux autres cas. Si l'on s'intéresse tout d'abord aux sédiments prélevés en sortie de STEP, on observe que le plasmide reste à des concentrations supérieures à 10⁶ copies/ μ g d'ADN au cours de l'essai. Parallèlement, le nombre de DH5 α augmente au cours des premières 72h passant de 10⁴ à 8.10⁴ copies/ μ g d'ADN pour revenir ensuite à un nombre proche de celui de départ et égal à 9.10³ copies/ μ g d'ADN en fin d'essai. On observe bien un maintien de DH5 α /pB10 dans le milieu. La chute observée à t = 72h pourrait être un artefact. Les contrôles d'inhibition effectués sur ces échantillons n'ayant pas montré de conditions inhibitrices de l'extrait d'ADN en q-PCR, il pourrait s'agir d'un problème lié à l'étape d'extraction. Le maintien de DH5 α /pB10 dans le milieu pourrait trouver son explication dans le fait que la DCO mesurée dans cet échantillon était 2 fois plus importante que celle mesurée dans les deux autres sédiments. Ceci traduit une concentration en matière organique oxydable dans le milieu importante qui aurait pu

permettre à DH5 α /pB10 de se maintenir. Mais ce maintien de DH5 α /pB10 dans les sédiments pourrait trouver d'autres origines et notamment des conditions environnementales particulières dues au fait que ces sédiments sont sous l'incidence directe des rejets de la STEP.

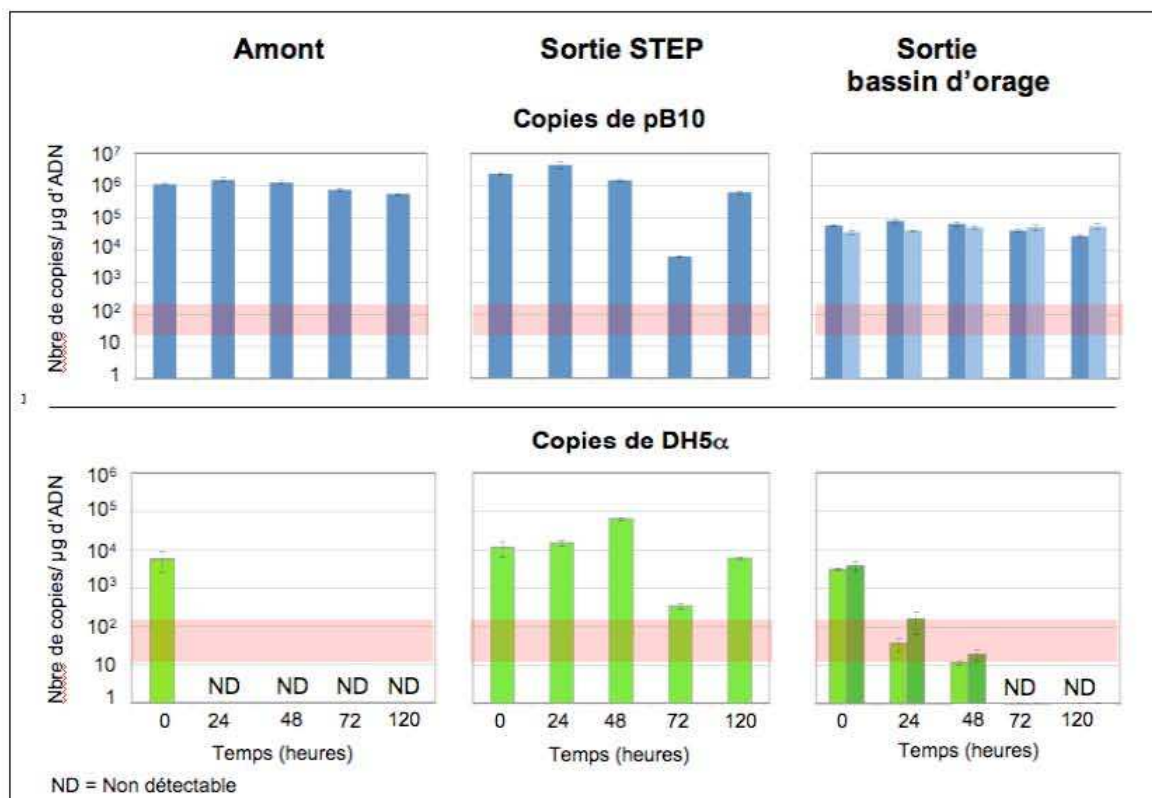


Figure 62 : Incidence de la nature de la matrice environnementale sur la stabilité et transfert du plasmide pB10 : sédiments de rivière. Les microcosmes de sédiments prélevés aux points amont et aval du rejet de la STEP ont été réalisés une seule fois. Chaque point représente une moyenne de 3 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en q-PCR). Les essais réalisés avec les sédiments « sortie d'orage » ont été répétés deux fois à partir d'un même prélèvement et chaque couleur d'histogramme correspond à une répétition. Chaque point représente une moyenne de 3 valeurs (un échantillon analysé en triplicat en q-PCR). La zone rouge définie sur les graphiques correspond à la zone d'incertitude de détection (perte de proportionnalité entre le nombre de copies d'ADN cible réellement présent et le nombre de copies détecté par q-PCR). En dessous de cette zone, les résultats obtenus ont été considérés comme des artefacts et considérés comme nuls et notés ND.

Pour ce qui est des deux autres sédiments, on observe une concentration de pB10 stable du début jusqu'à la fin de l'expérience proche de 10⁶ et 8.10⁴ copies/µg d'ADN pour les sédiments prélevés en amont et en sortie de bassin d'orage respectivement. Dans le même temps, DH5 α devient rapidement non détectable, au bout de 24h pour les sédiments prélevés sur le site amont et au bout de 72 h pour les sédiments prélevés en sortie de bassin d'orage. Dans ces deux cas, la discordance des profils obtenus pour pB10 et DH5 α indique qu'il y a eu transfert de pB10 vers les communautés bactériennes indigènes. Il existe bien un effet de la matrice sur le transfert. Reste à déterminer le ou les paramètres de cette matrice qui en sont

responsables. Plusieurs causes sont envisageables et par exemple, la structuration de l'habitat qui pourrait avoir un effet sur le transfert de pB10.

IV. Discussion

L'objectif central de notre étude était de pouvoir suivre les transferts du plasmide pB10 (portant des gènes de résistance aux antibiotiques) au sein de populations bactériennes complexes (boues biologiques issues de station d'épuration d'eaux usées urbaines) et d'autres environnements (sédiments de rivière). L'une des conclusions attendues était d'identifier certains paramètres susceptibles d'induire ou de favoriser la persistance et les transferts de plasmides. Pour suivre ces transferts *in situ* et s'affranchir des méthodes basées sur la culture bactérienne, deux approches avaient été envisagées. Une première basée sur un système rapporteur où le plasmide était étiqueté avec un gène *gfp* exprimé en cas de transfert du plasmide. Cette technique a montré ses limites dans des échantillons issus de l'environnement comme nous l'avons montré dans le chapitre I (incidence de l'insertion du gène rapporteur sur les propriétés du plasmide et la physiologie de la bactérie donneuse ; artefacts résultant de l'autofluorescence des boues). Une seconde approche basée sur une quantification moléculaire du plasmide par q-PCR a été développée avec succès et a permis de suivre spécifiquement les variations des nombres de copies du plasmide pB10 et de la bactérie donneuse *E. coli* DH5 α dans des extraits d'ADN totaux d'échantillons environnementaux différents. Cet outil de détection permet une détection fine des cibles ADN avec cependant quelques limitations qui sont discutées ci-dessous. Néanmoins, l'outil développé reste performant et des essais ont pu être menés dans des microcosmes optimisés pour maintenir les matrices environnementales dans des conditions stables de pH et oxygène dissous pendant 5 jours. Ils ont permis d'identifier plusieurs paramètres agissant sur le transfert du plasmide vers les communautés bactériennes indigènes qui sont discutés ici.

1. Détection du plasmide pB10 et de son hôte DH5 α à l'échelle moléculaire dans des matrices environnementales

Suivre l'évolution du nombre de copies du plasmide pB10 et de son hôte bactérien DH5 α a été possible grâce à des systèmes de détection sonde/amorces spécifiques par q-PCR. La technique de biologie moléculaire développée dans cette étude pour la quantification spécifique de pB10 et DH5 α , représente une approche novatrice car elle permet d'évaluer l'évolution du nombre de copies d'un élément mobile spécifique dans une matrice

environnementale. De plus la stratégie utilisée pour élaborer les couples sonde/amorces autour des jonctions de blocs génétiques uniques sur pB10 et DH5 α peut être étendue pour suivre l'évolution d'autres bactéries et plasmides. Cette approche permet de s'affranchir des biais des méthodes basées sur la culture bactérienne : en effet, on considère en général que moins de 1% des bactéries de l'environnement est cultivable et l'isolement des bactéries résistantes basé sur une sélection phénotypique (résistance antibiotique) implique que les gènes de résistance acquis par les bactéries soient exprimés. Par ailleurs, parce qu'elle est relativement sensible, cette approche biomoléculaire permet de ne pas perturber l'équilibre des communautés bactériennes indigènes avec l'apport d'inoculum de bactéries donneuses de taille trop importante, comme ce fut le cas avec des approches basées sur des méthodes de culture : inoculum compris entre 10^7 et 10^8 cellules/g de matrice contre $2,5 \cdot 10^5$ bactéries/mL dans nos expérimentations par exemple (van Elsas *et al.*, 2004).

La technique développée dans ce travail est d'une grande sensibilité car nous pouvons détecter jusqu'à une copie du plasmide pB10 et 5 copies de génome de DH5 α par réaction de q-PCR. Cependant, pour la quantification des deux systèmes de détection (de pB10 et de DH5 α), nous avons pu mettre en évidence une zone d'incertitude pour laquelle il n'y a plus de proportionnalité entre la quantité d'ADN cible présente et la quantité détectée en q-PCR. Cette zone est différente pour les deux ADN cibles (de 5 à 10 copies/réaction pour DH5 α et de 1 à 10 copies/réaction pour pB10). Quoi qu'il en soit, dans toutes les expérimentations menées en microcosme, les concentrations initiales de DH5 α et pB10 détectées étant supérieures à 10^4 et 10^5 copies/ μ g d'ADN respectivement (soit $7,5 \cdot 10^3$ et $5 \cdot 10^4$ copies par réaction), les phénomènes de disparition de pB10 et DH5 α sont bien visibles avant d'atteindre la zone d'incertitude de détection. Toutefois, même lorsque le plasmide et l'ADN de la bactérie donneuse ne sont plus détectés par cette technique, ils peuvent perdurer à des concentrations « faibles » (*i.e.* inférieures à la limite de détection) et on peut s'interroger sur la possibilité pour le plasmide, dans des conditions environnementales propices, d'être transféré et d'envahir la population bactérienne.

Nos résultats ont été considérés et discutés comme si l'on détectait l'intégralité des copies de pB10 et DH5 α présentes dans l'extrait d'ADN, mais l'ADN dit total n'est sans doute pas entièrement extrait des boues. Néanmoins, les tests effectués ont montré que même si en sous-estimant la concentration réelle des ADN de pB10 et DH5 α , il existe une proportionnalité entre la concentration réelle et la concentration détectée (facteur de proportionnalité variable

selon le type de matrice considérée compris entre 0,03 et 0,5 pour pB10 et entre 0,01 et 0,1 pour DH5 α).

Il est apparu que lors de l'étape d'extraction des ADN totaux, pB10 et le chromosome de DH5 α ne sont pas toujours extraits avec la même efficacité relative selon le type de matrice considéré (nous avons pu mettre en évidence ce phénomène avec les expérimentations réalisées sur différents types de matrices préalablement inoculées avec des concentrations connues de pB10 et de bactérie donneuse). Il en résulte ainsi un rapport copies de pB10 détectées/copies de génome de DH5 α détectées variable de 6 à 200. Il ne s'agit pas d'une variation du nombre de plasmides par rapport au nombre de donneuses mais bien d'un effet de la matrice qui semble retenir les ADN de grandes tailles (de plusieurs centaines de milliers de pb) plutôt que ceux de petite taille. De ce fait, on ne peut pas systématiquement comparer les résultats obtenus pour deux matrices de type différent en termes de nombre de copies. Si l'on cherchait à énumérer un marqueur donné, l'approche analytique ne pourrait donc pas être envisageable car selon le support génétique considéré (chromosome *versus* plasmide par exemple) on pourrait sous-estimer le nombre de copies présent dans l'échantillon. En revanche, le rapport copies de pB10 détectées/copies de génome de DH5 α détectées est de même ordre de grandeur dans des matrices de même origine, variant de 11 à 29 pour les boues biologiques et de 143 à 209 pour les sédiments de rivière. Par conséquent, pour un même type de matrice, les résultats restent comparables. Si on ne peut pas systématiquement comparer des nombres de copies détectées entre eux provenant d'échantillons différents, suivre l'évolution d'un élément génétique (diminution ou augmentation du nombre de copies détecté dans le temps) reste en revanche envisageable dans la mesure où elle ne concerne qu'une même matrice environnementale.

L'évolution du nombre de copies de pB10 en microcosme est un bilan entre transfert et disparition du plasmide, d'où la difficulté d'interprétation des phénomènes observés et la nécessité de pouvoir suivre l'évolution des populations de donneuses dans le temps. L'un de nos postulats de départ était que si DH5 α disparaît rapidement, les transferts de pB10 vers la flore indigène sont supposés plus visibles en ce sens où l'on a plus dans le bilan total du nombre de copies de pB10 ceux contenus dans la population de donneuse. Le choix de DH5 α comme bactérie donneuse a été motivé à partir de plusieurs critères. Premièrement il était nécessaire d'avoir une bactérie détectable par q-PCR de façon spécifique et la mutation U169 portée par le chromosome de DH5 α lui donne cet avantage. Deuxièmement, la bactérie donneuse n'étant utilisée que pour apporter le plasmide dans les communautés bactériennes, il

était important que cette bactérie donneuse ne se maintienne pas dans le système une fois le plasmide transféré afin d'observer un éventuel phénomène de transfert uniquement dans la communauté bactérienne indigène. Aussi, la bactérie donneuse DH5 α a été choisie car elle n'est *a priori* pas adaptée pour survivre dans des matrices environnementales testées (boues et sédiments). En effet, *E. coli* a déjà été montrée comme peu apte à se maintenir dans de telles conditions environnementales (Top *et al.*, 1990), sans compter les multiples altérations génétiques engendrées par une adaptation de DH5 α aux conditions de laboratoire qui réduisent d'autant sa capacité à se maintenir dans l'environnement. Au cours de nos différentes expérimentations, la disparition progressive de la bactérie DH5 α était variable, de 24 à 120 heures, selon les échantillons et les conditions considérés. Un seul cas fait cependant exception. Il s'agit de l'essai mené avec des sédiments de rivière prélevés en aval d'un rejet de station d'épuration et pour lequel la bactérie donneuse s'est maintenue dans le milieu avec même une augmentation de ses effectifs au cours de l'essai. Dans ce cas, le maintien de la donneuse pourrait trouver son explication dans la disponibilité de substrats carbonés (mesuré par DCO) en concentration 2 fois plus importante que dans le reste de la rivière. Dans leurs travaux, de nombreux auteurs ont déjà mis en évidence que la survie de *E. coli* dans l'environnement était plus forte dans des sédiments et influencée par la disponibilité de substrats carbonés (Boualam *et al.*, 2002 ; Bouteleux *et al.*, 2005 ; Gerba et McLeod, 1976 ; Top *et al.*, 1990).

2. De l'intérêt des microcosmes pour le maintien des matrices environnementales en laboratoire

Mimer l'environnement en laboratoire reste un exercice complexe et le maintien d'échantillons issus de l'environnement en microcosmes (boues biologiques issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines ou sédiments de rivière) a une incidence importante sur la physiologie et la diversité des populations bactériennes comme d'autres ont déjà pu le montrer spécifiquement (McGrady-Steed et Morin, 2000). De fait, les conditions de laboratoire engendrent des modifications au niveau de l'équilibre des populations bactériennes et de la diversité des espèces. L'amendement des microcosmes avec des éléments nutritifs énergétiques contribue au développement préférentiel de certaines espèces aux dépens d'autres. Aussi pour limiter ces modifications, il est impératif de travailler sur des temps courts et dans notre travail nous avons limité la durée des essais à quelques jours sans pouvoir toutefois apprécier les modifications parmi les populations bactériennes ni leur

impact possible sur les transferts. Les microcosmes utilisés dans cette étude sont des systèmes simples qui ont permis de maintenir les échantillons testés pendant 5 jours dans des conditions relativement stables de pH et d'oxygénation. Des montages comme celui développé dans notre étude ont été utilisés par d'autres auteurs et ont permis la mise en évidence de transferts de gènes en milieux aquatiques dont un grand nombre de ces exemples ont été présentés dans la revue de Ashelford *et al.* (1997).

3. Incidence des paramètres environnementaux sur la stabilité de pB10 ou de DH5 α /pB10

De très nombreux paramètres peuvent influencer la persistance de DH5 α /pB10 sans qu'il y ait nécessairement un transfert apparent de pB10. Aussi l'identification de l'effet d'une seule variable environnementale sur un phénomène multiparamétrique reste une gageure difficile à dépasser. Comme le montre la figure 63, sur l'ensemble des paramètres que nous avons testé, deux groupes de paramètres semblent particulièrement pertinents : brassage/oxygénation et ajout d'antibiotiques influent sur la variation de la biodiversité de nos microcosmes au cours du temps (seules des observations microscopiques qualitatives du nombre ont permis d'apprécier la présence ou l'absence des protozoaires).

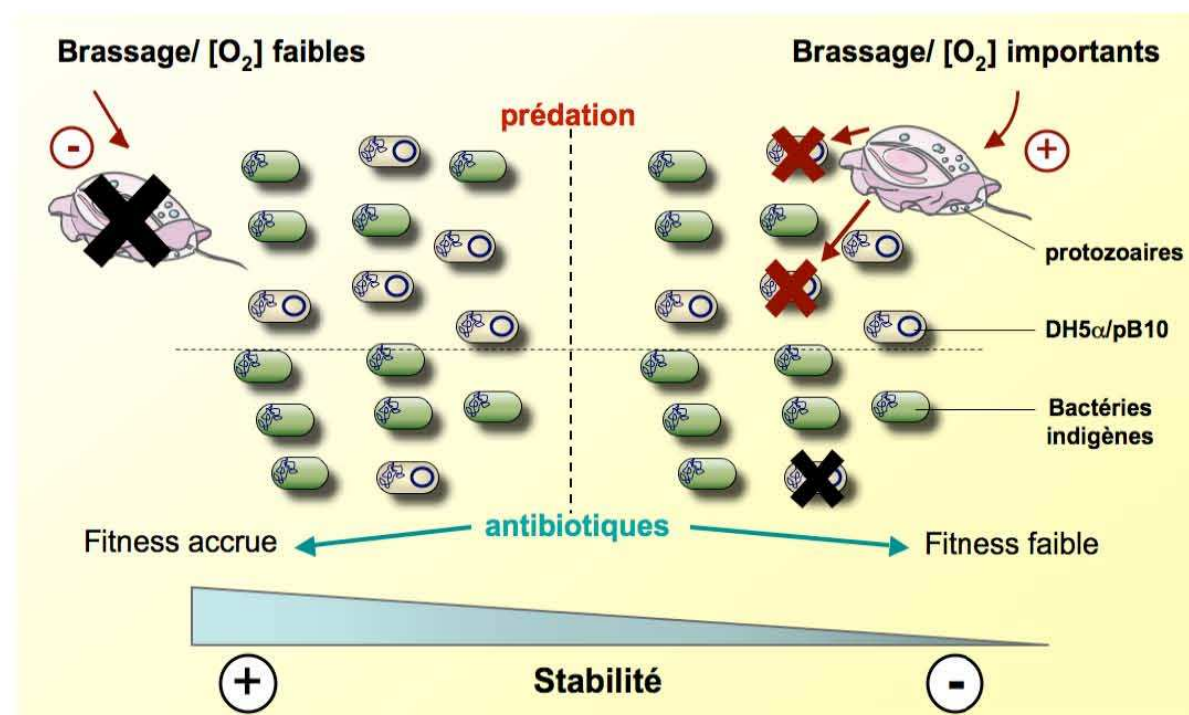


Figure 63 : Facteurs influençant la stabilité de DH5 α /pB10 au sein de peuplements microbiens complexes issus de l'environnement. La fitness d'un organisme se définit comme son aptitude à se maintenir dans un contexte environnemental donné.

Le premier fait observé est que, dans des boues biologiques brassées aérées, **la bactérie donneuse DH5 α /pB10 ne perdure pas dans le milieu** et le plasmide n'est pas transféré dans les communautés bactériennes. Les mêmes boues biologiques maintenues dans des conditions non brassées non aérées montrent que DH5 α /pB10 se maintient plus longtemps dans le milieu sans que l'on observe un transfert du plasmide. Une première hypothèse qui pourrait expliquer ce déclin est la **prédation par les protozoaires**. Les observations microscopiques ont pu montrer qu'au bout de 48 h il y avait une prolifération des populations de protozoaires dans les boues oxygénées brassées (les observations microscopiques initiales ont montré que les populations de protozoaires étaient largement détruites par le mixage préalable des boues avant le montage des microcosmes). En revanche dans les boues non oxygénées non brassées, les populations de protozoaires ne se rétablissent pas et le nombre de protozoaires présents reste très limité et équivalent à moins d'un dixième des effectifs initialement présents. Ainsi la prédation par les protozoaires pourrait largement contribuer à faire disparaître DH5 α /pB10 dans les boues aérées brassées comme cela a déjà été démontré dans des sols (Sørensen *et al.*, 1999) ou dans des environnements aquatiques (boues activées, eaux de rivières ou réseaux d'eau potable) (Güde, 1979 ; Joaquim-Justo *et al.*, 2006 ; Sibille *et al.*, 1998). À titre d'exemple, les travaux de Sørensen *et al.* (1999) ont mis en évidence cet effet des protozoaires sur le maintien de *Escherichia coli* K12 *sp* (J53/RP4) dans des échantillons de sol. L'ajout d'un inhibiteur des eucaryotes dans les échantillons de sol testés et amendés avec la bactérie avait pour conséquence d'augmenter la survie de la bactérie dans le sol. Il y a donc une implication directe de la prédation sur la survie de la bactérie donneuse.

Un autre facteur améliorant la stabilité de DH5 α /pB10 est l'ajout d'antibiotiques. En effet, dans nos essais, l'ajout d'amoxicilline ou de sulfaméthoxazole dans les boues biologiques en concentrations relativement basses, proches des plus faibles concentrations inhibitrices connues (15 μ g/L et 12 μ g/L respectivement) (base de données des CMI, laboratoire de bactériologie clinique de la faculté de pharmacie de Lille : http://pharmaweb.univlille2.fr/apache2default/labos/Bacteriologie/base_de_donnees/interrogationBD.php) favorise le maintien de DH5 α /pB10 dans le milieu, et cette réponse est dose-dépendante pour le sulfaméthoxazole. Ceci est encore plus marqué lorsque l'on se trouve en conditions non brassées non oxygénées des boues. On peut émettre l'hypothèse que l'antibiotique donne un avantage sélectif à DH5 α /pB10, tout en ayant entraîné le déclin (ou l'inhibition) d'espèces bactériennes indigènes sensibles au sulfaméthoxazole même à ces

doses faibles comme le suggéraient Dokianakis *et al.* (2004). On peut également se demander si l'antibiotique n'a pas un effet sur la prédation en agissant négativement sur la résurgence des protozoaires dans le milieu, le sulfaméthoxazole ayant été caractérisé comme actif sur de nombreuses espèces de protozoaires (Gupta *et al.*, 2004 ; Ortega et Eberhard, 2008).

Notons finalement que sur l'ensemble des essais réalisés dans différentes matrices, il a été constaté que la disparition de pB10 est toujours concomitante à une disparition de DH5 α . Une perte du plasmide seule n'a jamais été observée. Rappelons à cet égard que pB10 code pour un système « poison/antidote » codé par les gènes *din/kor* qui permet un maintien et une transmission stable du plasmide dans la bactérie donneuse et sa descendance, comme ce fut observé par De Gelder *et al.* (2004) chez *E. coli*.

4. Incidence des paramètres environnementaux sur le transfert de pB10

Dans certaines conditions, nous avons pu montrer un transfert de pB10 (traduit par le fait que le nombre de bactéries donneuses détecté diminue avec le temps alors que celui de pB10 reste constant). C'est le cas des essais conduits, avec des boues de digesteur anaérobie, avec des biomasses fixées issues du procédé Kaldnes, ainsi que les sédiments de rivière. Le phénomène est plus ou moins important selon la matrice considérée. On peut reconnaître deux facteurs susceptibles d'influencer le transfert de pB10 comme indiqués sur la figure 64 : la nature de l'habitat microbien et la diversité bactérienne de l'échantillon.

Les boues biologiques issues d'un digesteur anaérobie représentent un environnement favorable au transfert. Cependant l'absence de dioxygène dans ce type d'environnement n'est sans doute pas le paramètre qui explique ces transferts. En effet, nos expériences menées sur des boues de bassin biologique montrent que l'aération n'a pas d'incidence sur le transfert de pB10. D'ailleurs, Zhong *et al.* (2010) ont également montré que l'oxygène n'était pas un facteur déterminant sur les transferts de pB10 en prouvant qu'aucune différence n'avait été observée dans les efficacités relatives de transfert en aérobie et anaérobie au cours de leurs expérimentations. Au contraire, on peut supposer que la biodiversité de ces systèmes anaérobies (Godon *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 2010), le moindre nombre de protozoaires, et la disponibilité en matière organique sont sans doute des facteurs explicatifs. En effet des expériences contrôles avec des boues biologiques issues d'un bassin aérobie, mais maintenues dans les mêmes conditions rencontrées dans des digesteurs anaérobies (35°C et anaérobiose) n'ont pas permis de montrer de transfert du plasmide.

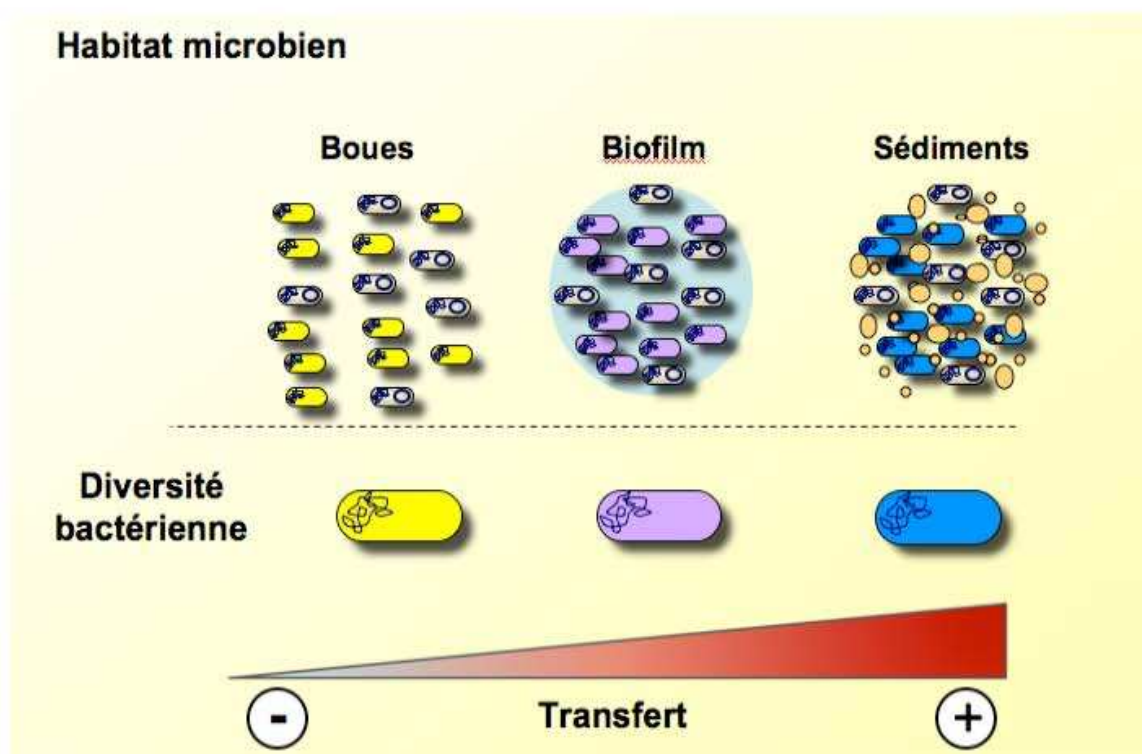


Figure 64 : Facteurs influençant le transfert de pB10 dans les matrices environnementales testées.

Dans leurs travaux, Zhong *et al.* (2010) et Fox *et al.* (2008) ont montré que les bactéries planctoniques avaient peu de chance de pouvoir transférer un plasmide IncP si les concentrations cellulaires n'étaient pas supérieures à 10^{10} UCF.mL⁻¹. Dans les boues non brassées, non aérées, préalablement dispersées par mixage, nos observations microscopiques ont pu montrer que le floc déstructuré ne se reformait pas à l'identique. De plus, les conditions d'anaérobiose engendrent des modifications au niveau de la dynamique de ces populations à dominante aérobie. Sous l'effet du métabolisme et du pH, les flocs se dispersent. Au bout de 48 h, les observations microscopiques ont montré qu'aucune structure agrégée n'était observée et les bactéries présentes dans le milieu se trouvaient sous forme libre planctonique. La forme libre des bactéries dans le milieu pourrait dans ce cas être une explication de cette absence de transfert.

Les essais menés sur les biomasses fixées issues du procédé Kaldnes montrent des phénomènes de transfert plus marqués que dans les boues anaérobies (car la bactérie donneuse n'est plus détectable dans le milieu après 48 h). Dans ce cas, l'organisation en biofilm sur les disques de polyéthylène pourrait favoriser les transferts, notamment en procurant un environnement plus ou moins statique permettant un contact cellulaire via des pili conjugatifs sans risque de rupture mécanique. Bien que l'agitation puisse augmenter les chances de rencontre des deux partenaires du transfert, il est nécessaire qu'un contact

intercellulaire puisse s'établir de façon durable pour que l'échange d'ADN ait lieu. Les plasmides IncP codent pour des petits pilis rigides permettant d'établir le contact cellulaire entre cellules donneuses et cellules receveuses (Kuikman *et al.*, 1990). Ces types de pili rigides sont plus fragiles que les pilis souples qui eux autorisent plus facilement un transfert entre bactéries en suspension (cas du plasmide F par exemple). Les forces de cisaillement engendrées par l'agitation pourraient empêcher ce contact cellulaire et de ce fait interdire le transfert (Bradley *et al.*, 1980). À cet égard, l'incidence de l'agitation sur le transfert de pB10 a été mise en évidence dans les travaux de Zhong *et al.* (2010). Dans ces travaux, une *E. coli* MG1655/pB10 a été mise en culture avec une dérivée Nal^R de MG1655 dans un milieu LB pendant 3 h, brassé à différentes vitesses d'agitation (0, 50, 100, 200, 300 rpm). À l'issue de la culture, les transconjuguants ont été dénombrés sur milieux LB-agar sélectifs. Les résultats ont mis en évidence un maximum de transfert de pB10 pour des agitations de 50 et 100 rpm et un transfert plus limité à la fois lorsque l'agitation du milieu dépassait 200 rpm ou en absence totale d'agitation. Par ailleurs, l'organisation des bactéries en biofilm a souvent été décrite comme un facteur favorable au transfert des plasmides (Ashelford *et al.*, 1997 ; Bradley *et al.*, 1980 ; Ehlers et Bower, 1999 ; Hausner et Wuerz, 1999 ; Hill et Top, 1998 ; Krone *et al.*, 2007).

Nos observations suggèrent qu'il est nécessaire qu'un brassage soit assuré pour augmenter la probabilité de rencontre des bactéries donneuses et receveuses avant transfert. Cependant il faut une absence ou des conditions particulières limitant l'effet du brassage pour des raisons mécaniques (pendant le transfert) afin de ne pas risquer de casser le pili nécessaire au transfert.

De plus, des essais menés au laboratoire par A. Meteghe et C. Merlin ont pu mettre en évidence l'avantage de pB10 pour la bactérie donneuse dans sa capacité à adhérer et former des biofilms, suggérant ainsi une piste pour expliquer les transferts au sein de ces biomasses fixées (Figure 65). D'une manière générale, plusieurs travaux ont montré la relation entre la présence de plasmides, l'adhésion des bactéries (Ong *et al.*, 2009 ; Clewell 2007 ; Baldini *et al.*, 1983). En complément, Ghigo (2001) a montré que les plasmides exprimant constitutivement un pili conjugatif favorisaient la formation de biofilm.

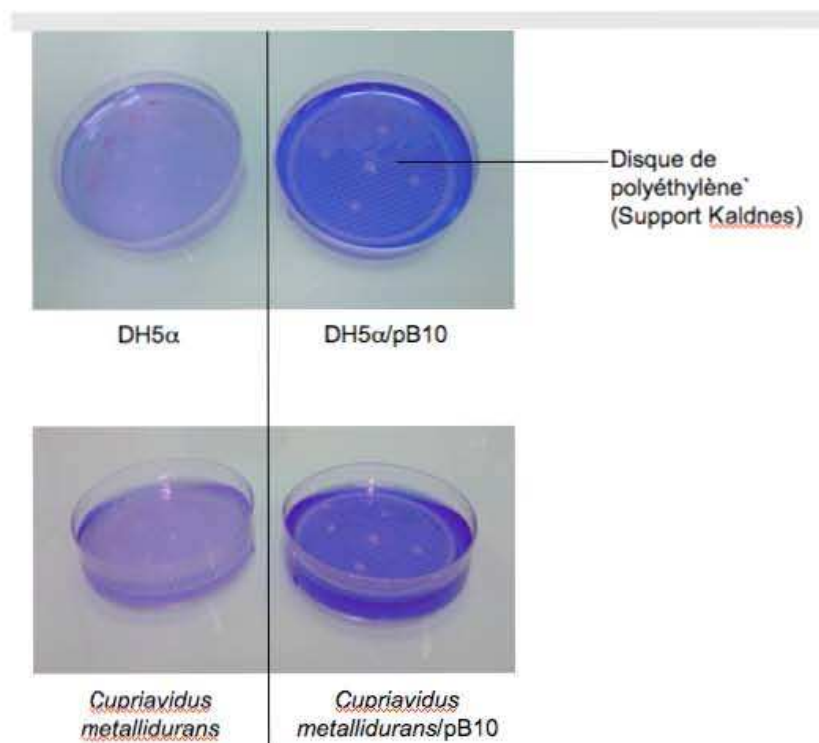


Figure 65 : Incidence du plasmide sur les capacités de DH5α et AE815 à former des biofilms. Les photographies montrent la quantité de cristal violet retenu par la biomasse après redissolution à l'acide acétique. Pour cela deux espèces bactériennes (*E. coli* DH5α et *Cupriavidus metallidurans* CM49) ont été cultivées à 30°C pendant une nuit sous agitation dans du milieu LB contenant un disque de polyéthylène utilisé dans le procédé Kaldnes. Une part des essais a été réalisée avec la bactérie parentale et l'autre part avec la bactérie transformée par pB10. La phase aqueuse a été éliminée et les bactéries associées au disque ont été colorées au cristal violet afin d'effectuer un dosage de la biomasse fixée (Crédit : A. Meteghe et C. Merlin ; LCPME).

Dans les essais réalisés avec des biomasses fixées sur support (procédé Kaldnes), le nombre de copies de pB10 est resté stable au cours du temps et sans augmentation de ce dernier malgré le transfert vers la flore indigène. On suppose ici que la bactérie donneuse transfère son plasmide aux bactéries receveuses dans son environnement proche. Ainsi, le nombre de receveuses potentielles se trouve de fait limité à l'environnement immédiat des bactéries donneuses (qu'il s'agisse de l'inoculum ou d'ex-transconjugant). De ce fait, le transfert peut être perçu comme une réaction saturante, dictée par la probabilité de rencontre entre bactéries donneuses et receveuses. Le transfert pourrait intervenir rapidement au début de l'essai et cesser rapidement faute de receveuses potentielles dans l'environnement proche des transconjugants. Le transfert de pB10 de DH5α/pB10 vers les bactéries indigènes a probablement eu lieu dans les premières 24 h, comme rapporté dans un contexte différent par Licht *et al.* (1999), mais il faut attendre la disparition de la bactérie donneuse pour observer pleinement le phénomène de transfert plasmidique de DH5α/pB10 vers les bactéries indigènes. L'estimation du nombre des transconjugants en fin d'expérimentation dans les

travaux de Licht *et al.* a montré que selon les conditions initiales, ces transconjuguants représentaient de 1 à 10% de la population totale du biofilm. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études basées sur le suivi *in situ* du transfert du plasmide TOL modifié génétiquement par insertion d'un gène *gfp* (Christensen *et al.*, 1996 ; Christensen *et al.*, 1998 ; Haagensen *et al.*, 2002). Leurs observations ont montré que les bactéries receveuses situées à la surface du biofilm avaient acquis le plasmide, alors que celles situées au centre des microcolonies ou du biofilm n'avaient pas reçu le plasmide. Ces études montrent bien que le transfert est efficace mais limité aux zones accessibles du biofilm et qu'une faible partie des bactéries receveuses peut acquérir le plasmide. L'hypothèse avancée par les auteurs pour expliquer cette absence de transfert de la surface du biofilm vers l'intérieur est qu'il existe une variation de l'activité métabolique tout le long de la profondeur du biofilm. Les cellules sont métaboliquement plus actives et la fréquence de divisions cellulaires est plus importante à la surface des biofilms. Haagensen *et al.* (2002) ont d'ailleurs mis en évidence la corrélation entre le niveau d'activité des bactéries donneuses et receveuses et le transfert d'un plasmide en biofilm (plasmide TOL dans ce cas).

Cette difficulté de transfert dans les couches internes du biofilm pourrait alors être expliquée par la disponibilité en nutriments. Dans un environnement où les microorganismes sont en compétition pour la disponibilité des nutriments, la fréquence de transfert peut être largement réduite (van Elsas *et al.*, 2000). Cependant, les travaux de Licht *et al.* (1999) avaient montré que la concentration en nutriments dans le biofilm n'était pas un facteur susceptible d'affecter le transfert plasmidique. Une hypothèse alternative pourrait être que la matrice exopolymérique dense à l'intérieur du biofilm empêcherait l'établissement des contacts cellulaires nécessaires à la conjugaison (Molin et Tolker-Nielsen, 2003).

Les mêmes phénomènes de transfert de pB10 dans les communautés bactériennes ont pu être observés dans certains sédiments que nous avons utilisés. C'est seulement dans les sédiments prélevés au niveau de la sortie du bassin d'orage d'eau de pluie que l'on observe un transfert du plasmide vers les populations indigènes. Ces sédiments diffèrent largement de ceux prélevés au niveau des deux autres sites (amont et aval de la station d'épuration d'eaux usées urbaines). En effet, leur fraction sédimentaire, est composée de particules de granulométrie variable. Outre les sables, de nombreuses particules de tailles plus ou moins importantes (jusqu'à quelques cm), ainsi que de nombreux déchets organiques en décomposition (morceaux de bois, feuilles,) et des couches de vases sont présentes. Ces particules de tailles variables sont autant de surfaces colonisables présentant peut-être une source de nutriments

importante et un habitat favorable au transfert du fait de la densité de microorganismes métaboliquement actifs au sein de biofilms favorables au transfert (Hill *et al.*, 1994 ; Muela *et al.*, 1994 ; Jones *et al.*, 1991). Les mêmes explications que celles énoncées précédemment pour le biofilm dans le procédé à biomasse fixée Kaldnes peuvent en partie expliquer ces transferts. En effet, dans leurs travaux, Day *et al.* (1992) et Perkins *et al.* (1994) ont utilisé des microcosmes d'eau de rivière dans lesquels se trouvaient des pierres et graviers où avaient été fixées des membranes colonisées par les bactéries donneuses et receveuses. Les résultats de leurs expérimentations montrent que le transfert plasmidique a lieu à la surface du biofilm et que la plupart des transconjugants ont été détectés immédiatement après inoculation. Des conclusions similaires ont été apportées par Ashelford *et al.* (1997) même si dans ce cas les fréquences de transfert entre bactéries indigènes établies dans leur habitat naturel étaient moins importantes que celles observées en conditions de laboratoire avec des espèces fraîchement cultivées.

Un brassage de l'échantillon du sédiment (tel que celui survenu lors de l'échantillonnage journalier des microcosmes) alterné avec des périodes de repos (incubation en conditions statiques au laboratoire) pourrait permettre d'augmenter les transferts. En effet, cette agitation mécanique préalable favoriserait les rencontres entre les bactéries donneuses et des bactéries receveuses. Dans leurs travaux Fox *et al.* (2008) ont pu mettre en évidence que la combinaison de 24 h sans agitation et d'une brève perturbation du milieu par agitation amélioreraient l'invasion des communautés bactériennes par le plasmide pB10 (passant de 13% dans un environnement non perturbé à 98% de la population bactérienne dans un même environnement mais quotidiennement perturbé pendant 15 jours). Les hypothèses émises par les auteurs étaient que l'agitation permettait soit une redistribution spatiale favorisant le déplacement des bactéries donneuses vers les potentielles receveuses, soit entraînait des conditions environnementales variables et favorables à la bactérie donneuse pour induire un transfert du plasmide.

Conclusion - Perspectives

Conclusion – Perspectives

L'objectif de notre travail était d'identifier et d'étudier des facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la persistance et la dissémination du plasmide modèle pB10 dans des communautés bactériennes de boues biologiques maintenues en microcosmes. Parmi les retombées attendues de ce projet de recherche figuraient l'acquisition de nouvelles connaissances qui permettraient une « meilleure » gestion des STEP si elles devaient s'avérer être une zone propice au transfert de gènes de résistance aux antibiotiques.

Au moment où ces travaux ont été initiés, les techniques utilisables pour l'étude des transferts de gènes en matrice environnementale étaient limitées aux approches basées sur la culture bactérienne et à celles basées sur des variants génétiques permettant de suivre l'apparition de transconjugants *in situ* par épifluorescence. Comme discuté dans ce manuscrit, ces deux approches présentent toutes deux des limites : problèmes liés à la cultivabilité et la sélection des bactéries environnementales, ou encore modification des propriétés d'un élément mobile et de son hôte suite à des modifications génétiques pour des approches par épifluorescence, sans compter les problèmes liés à l'autofluorescence de certaines matrices environnementales. Ces limitations expérimentales nous ont finalement conduit à développer notre propre approche basée sur la q-PCR.

Notre approche est un outil innovant pour l'étude des transferts de gènes reposant sur la détection et la quantification d'un élément génétique mobile précis dans une matrice environnementale. En effet, la subtilité sur laquelle nous avons basé les systèmes de sonde/amorces au niveau de jonctions uniques entre modules génétiques pour pB10 donne une spécificité de détection remarquable. Elle permet de suivre l'évolution du nombre de copies de pB10 par rapport au nombre de copies de son hôte bactérien. Si ce rapport augmente, ceci est synonyme de transfert. Sur le principe, une telle approche ne se limite pas à l'étude du plasmide pB10 et pourrait facilement être étendue à d'autres plasmides et d'autres éléments mobiles comme des transposons par exemple.

Cette approche nous a permis d'étudier l'influence de certains paramètres environnementaux sur la persistance et la dissémination de pB10 dans des communautés bactériennes de STEP. A la lumière de ces résultats, et avec toute la modération liée au fait d'avoir travaillé en microcosmes et avec un plasmide modèle, nous avons pu observer que selon les conditions environnementales le plasmide va, soit décliner, soit être transféré vers la flore bactérienne indigène. Le transfert de pB10 semble favorisé au sein de certaines matrices

environnementales : les boues anaérobies, les biofilms sur disques de polyéthylène (Kaldnes) et les sédiments de rivière. Dans des boues biologiques, quelles que soient les conditions testées (brassées aérées, non aérées non brassées, origines des boues, ajout d'antibiotiques) aucun transfert de pB10 n'a été observé et le nombre de copies de plasmide diminue de façon plus ou moins rapide selon les conditions. D'un point de vue pratique, ces observations pourront intéresser les acteurs des filières de traitement des eaux usées dans le cadre de la maîtrise de leur rejet. En effet, sans être responsables de l'origine de ces antibiorésistances, certains procédés d'épuration ou conditions mises en oeuvre dans le traitement des eaux usées pourraient être plus favorables que d'autres à la dissémination de gènes de résistance. Une bonne connaissance des phénomènes impliqués pourrait alors aider à faire des choix dans la mise en place et la gestion des STEP. Les étapes successives de traitement qui constituent la STEP peuvent avoir des effets différents, et certaines étapes ou procédés pourraient apparaître plus critiques que d'autres pour limiter les rejets de bactéries résistantes (ex : boues anaérobies *versus* boues de bassin biologique, boues de bassin biologique *versus* réacteurs à biomasse fixée). Il n'y aura, certes, jamais de rejet zéro, mais celui-ci pourrait être limité en favorisant certains procédés d'épuration. À cet égard, les procédés utilisant des boues biologiques semblent limiter les transferts d'éléments génétiques tel que pB10. De même, les conditions d'oxygénation et de brassage des boues sont des facteurs moins propices à la dissémination comme nous l'avons vu dans notre étude. À toutes fins utiles, notons que les STEP avec bassins de boues biologiques aérobies représentent le procédé de traitement des eaux usées le plus répandu à l'heure actuelle.

Quoi qu'il en soit, la dissémination n'est peut-être pas non plus le seul phénomène à considérer. En effet, la simple persistance d'un élément génétique mobile vecteur d'antibiorésistances est probablement un facteur important puisque, en atteignant un nouvel environnement favorable l'élément pourra à nouveau se propager. À ce propos, nous avons vu que pB10 ne se propageait pas en boues de bassin biologique mais qu'il se disséminait bien en boues de digesteurs anaérobies. En replaçant ces éléments dans le contexte de la STEP on peut émettre l'hypothèse qu'en augmentant la persistance d'éléments mobiles comme pB10 dans les bassin biologique, on augmente d'autant les risques de propagation de ces éléments en aval dans les digesteurs anaérobies. Des facteurs environnementaux tels que la présence d'antibiotiques qui augmentent la persistance d'éléments comme pB10 dans les boues peuvent alors indirectement favoriser le transfert ultérieurement.

Certains environnements peuvent favoriser le maintien de pB10. À cet égard, nous avons montré que DH5 α /pB10 persistait sous l'incidence de certains facteurs environnementaux et

notamment les antibiotiques. Dans le cadre de notre modèle d'étude, l'amoxicilline et le sulfaméthoxazole n'ont pas favorisé le transfert mais ont augmenté la persistance de pB10 dans les boues biologiques, malgré leurs concentrations sub-inhibitrices. Il est probable que d'autres antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices puissent avoir un effet sur le comportement du plasmide même en absence de gènes de résistance correspondants. Les fluoroquinolones, par exemple, sont connues pour favoriser le transfert de plasmides en induisant le système SOS dans plusieurs modèles (Pesci *et al.*, 1999 ; Beaber *et al.*, 2004 ; Nordmann et Poirel, 2005) et il serait sans doute judicieux de tester de tels antibiotiques sur la persistance et la dissémination de pB10.

Les résultats que nous avons obtenus sont probablement influencés par le modèle hôte/plasmide que nous avons choisi. La nature de la bactérie donneuse est justement un critère intéressant qui mériterait d'être étudié dans des travaux ultérieurs. On sait que la nature des bactéries engagées dans des échanges de gènes influence les efficacités de transfert et il serait alors intéressant de déterminer si certains groupes taxonomiques sont plus aptes que d'autres à initier l'invasion de communautés par un élément génétique mobile donné. Une telle connaissance permettrait à terme de mieux prédire le comportement de certains écosystèmes au regard du transfert de gène en fonction du type de communautés microbiennes qu'ils hébergent, que ce soit au niveau de la STEP ou en aval après rejet dans l'environnement.

Références bibliographiques

Adameczyk M., Jagura-Burdzy G., 2003, Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids, *Acta Biochimica Polonica*, 50:425-453.

Adameczyk M., Dolowy P., Jonczyk M., Thomas C.M., Jagura-Burdzy G., 2006, The krfA gene is the first in a tricistronic operon required for survival of IncP-1 plasmid R751, *Microbiology*, 152:1621-1637.

Agersø Y., Bruun M.S., Dalsgaard I., Larsen J.L., 2007, The tetracycline resistance gene tet(E) is frequently occurring and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. from fish farms, *Aquaculture*, 266:47-52.

Altschul S. F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., 1995, Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews*, 59:143-169.

Andersen J.B., Sternberg C., Poulsen L.K., Bjørn S.P., Givskov M., Molin S., 1998, New Unstable Variants of Green Fluorescent Protein for Studies of Transient Gene Expression in Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6): 2240-2246.

Ashelford K.E., Fry J.C., Day M.J., Hill K.E., Learner M.A., Marchesi J.R., Perkins C.D., Weightman A.J., 1997, Using microcosms to study gene transfer in aquatic habitats, *FEMS Microbiology and Ecology*, 23:81-94.

Auerbach E.A., Seyfried E.E., McMahon K.D., 2007, Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants, *Water Research*, 41:1143-1151.

Averhoff B., 2004, DNA transport and natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria, *Journal of Bioengineering and Biomembrane*, 36:25-33.

Bagge N., Schuster M., Hentzer M., Ciofu O., Givskov M., Greenberg E.P., Høiby N., 2004, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4):1175-1187.

Baldini M.M., Kaper J.B., Levine M.M., Candy D.C.A., Moon H.W., 1983, Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*, *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 2(3): 534-538.

Bale M.J., Fry J.C., Day M.J., 1987, Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to the river stones, *Journal of General Microbiology*, 133: 3099-3107.

Baquero F., Martine J. L., Canton R., 2008, Antibiotics and antibiotic resistance in water environments, *Current Opinion in Biotechnology*, 19:260-265.

Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K., 2004, SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes, *Nature*, 427:72-74.

Bell J.M., Paton J.C., Turnidge J., 1998, Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 36:2187-2190.

Bergogne-Bérézin E., 2004, Comment améliorer la prescription des antibiotiques?, *La Presse Médicale*, 33(13):896-901.

Blake D.P., Hillman K., Fenlon D.R., Low J.C., 2003, Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions, *Journal of Applied Microbiology*, 95:428-436.

Blattner F.R., Plunkett III G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y., 1997, The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, 277:1453-1474.

Boualam M., Mathieu L., Fass S., Cavard J., Gatel D., 2002, Relationship between coliform culturability and organic matter in low nutritive waters, *Water Research*, 36:2618-2626.

Bourrain M., Achouak W., Urbain V., Heulin T., 1999, DNA extraction from activated sludges, *Current Opinion in Microbiology*, 38:315-319.

Bouteleux C., Saby S., Tozza D., Cavard J., Lahoussine V., Hartemann P., Mathieu L., 2005, *Escherichia coli* behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals, *Applied and Environmental Microbiology*, 71:2734-740.

Bradley D.E., Taylor D.E., Cohen D.R., 1980, Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12, *Journal of Bacteriology*, 143:1466-1470.

Breidenstein E.B., Khaira B.K., Wiegand I., Overhage J., Hancock R.E., 2008, Complex ciprofloxacin resistance revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:4486-4491.

Burrus V., Pavlovic G., Decaris B., Guedon G., 2002, Conjugative transposons: the tip of the iceberg, *Molecular Microbiology*, 46:601-610.

Byrne-Bailey K.G., Gaze W.H., Kay P., Boxall A.B., Hawkey P.M., Wellington E.M., 2009, Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53(2):696-702.

Cabello F.C., 2006, Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture : a growing problem for human and animal health and for the environment, *Environmental Microbiology*, 8:1137-1144.

Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L., Brussow, H., 2003, Phage as agents of lateral gene transfer, *Current Opinion in Microbiology*, 6:417- 424.

Capozzi V., Spano G., 2009, Horizontal gene transfer in the gut : It is a risk ?, *Food Research International*, 42:1501-1502.

Chen I., Dubnau D., 2004, DNA uptake during natural transformation, *Nature Reviews. Microbiology*, 2:241-249.

Christensen B.B., Sternberg C., Molin S., 1996, Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from *aequorea victoria* as a marker, *Gene*, 173:59-65.

Christensen B.B., Sternberg C., Andersen J.B., Eberl L., Møller S., Givskov M., Molin S., 1998, Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community, *Applied and Environmental Microbiology*, 64:2247-2255.

Clewell D.B., 2007, Properties of *Enterococcus faecalis* plasmidnext term pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin, *Plasmid*, 58(3):205-227.

Cohan F.M., Roberts M.S., King E.C., 1991, The potential for genetic exchange by transformation within a natural population of *Bacillus subtilis*, *Evolution*, 45:1383-1421.

Courvalin P., 2008, Can pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters provide dosing regimens that are less vulnerable to resistance?, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI*, 14:989-994.

Cruz-Rodz A.L., Gilmore M.S., 1990, High efficiency introduction of plasmid DNA into glycine treated *Enterococcus faecalis* by electroporation, *Molecular and General Genetics*, 224:152-154.

Curcio M.J., Derbyshire K.M., 2003, The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4:865-877.

Dahlberg C., Bergstrom M., Hermansson M., 1998, *In situ* detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:2670-2675.

Datta N., Hughes V.M., 1983, Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics, *Nature*, 306:616-617.

Daughton C.G., Ternes T.A., 1999, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?, *Environmental Health Perspectives*, 107:907-938.

Davies J., 1995, Vicious circles: looking back on resistance plasmids, *Genetics*, 139:1465-1468.

Davies J., 2006, Are antibiotics naturally antibiotics?, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33:496-499.

Davis J., 2007, Microbes have the last word, *MBO reports*, 8(7):616-621.

Davison J., 1999, Genetic Exchange between Bacteria in the Environment, *Plasmid*, 42:73-

Day M.J., Fry J.C., Diaper J., 1992, Effect of host cell physiology on plasmid transfer in river epilithon, *In Gene transfers and environment – proceedings of the third European meeting on bacterial genetics and ecology (BAGECO-3)*, Gauthier M.J. (ed), Springer-Verlag, Villefranche-sur-Mer, France, 35-50.

De Gelder L., Ponciano J. M., Abdo Z., Joyce P., Forney L. J., Top E. M., 2004 Combining mathematical models and statistical methods to understand and predict the dynamics of antibiotic-sensitive mutants in a population of resistant bacteria during experimental evolution. *Genetics*, 168:1131-1144.

De Gelder L., Vandecasteele F.P., Brown C.J., Forney L.J., Top E.M., 2005, Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9):5309-5317.

De Vries J., Meier J., Wackernagel W., 2001, The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter sp* by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells, *FEMS Microbiology Letters*, 195:211-215.

Deschamps J. R., Miller C. E. and Ward K. B., 1995, Rapid Purification of Recombinant Green Fluorescent Protein Using the Hydrophobic Properties of an HPLC Size-Exclusion Column, *Protein Expression and Purification*, 6(4):555-558.

Deziel E., Lepine F., Millot S., He J., Mindrinos M.N., Tomkins R.G., Rahme L.G., 2004, Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 101:1339-1344.

Dokianakis S.N., Kornaros M.E., Lyberatos G., 2004, On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation, *Water Science and Technology*, 50(5):341-346.

Dong D., Yan A., Liu H., Zhang X., Xu Y., 2006, Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate, *Journal of Microbiological Methods*, 66:217-222.

Doucet-Populaire F., Trieu-Cuot P., Dosbaa I., Andreumont A., Courvalin P., 1991, Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35:185-187.

Dreiseikelmann B., 1994, Translocation of DNA across bacterial-membrane, *Microbiological Revue*, 58:293-316.

Dröge M., Pühler A., Selbitschka W., 2000, Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge, *Molecular and General Genetics*, 263:471-482.

Dubnau D., 1999, DNA uptake in bacteria, *Annual Revue of Microbiology*, 53:217-244.

Ehlers L.J., Bouwer E.J., 1999, RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor, *Water Science and Technology*, 39:163-171.

Elseviers M.M., Ferech M., Vander Stichele R.H., Goossens H. and the ESAC project group, 2006, Antibiotic use in ambulatory care in Europe (ESAC data 1997–2002): trends, regional differences and seasonal fluctuations, *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, doi:10.1002/pds.1244.

Errampalli D., Leung K., Cassidy M.B., Kostrzynska M., Blears M., Lee H., Trevors J.T., 1999, Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, 35:187-199.

Fajardo A., Martinez J.L., 2008, Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses, *Current Opinion in Microbiology*, 11:161-167.

Ferech M., Coenen S., Malhotra-Kumar S., Dvorakova K., Hendrickx E., Suetens C., 2006, European surveillance of antimicrobial consumption outpatient antibiotic use in Europe, *Antimicrobial Chemotherapy*, 10:1093.

Fernandez-Astorga A., Muela A., Cisterna R., Iriberry J., Barcina I., 1992, Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 58:392-398.

Ferrara A.M., 2006, Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27:183-195.

Fluit A.C., Schmitz F.J., 2004, Resistance integrons and superintegrons, *Clinical Microbiology and Infection*, 10:272-288.

Fox R.E., Zhong X., Krone M., Top E.M., 2008, Spatial structure promote invasion of IncP-1 plasmids in bacterial populations, *The ISME journal*, 2(10):1024-1039.

Franke A.E., Clewell D.B., 1981, Evidence for a chromosome- borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid, *Journal of Bacteriology*, 145:494-502.

Frost L.S., 2009, Conjugation, Bacterial, pp. 517-531, *In Encyclopedia of Microbiology 3th Edition*, Schaetchter M. (ed), Academic Press, San Diego State University, CA, USA.

Fry J.C., Day M.J., 1990, Plasmid transfer in the epilithon, pp. 80-88, *In Bacterial Genetics in Natural Environments*, Fry J.C., Day M.J. (eds), Chapman and Hall, London, UK.

Galimand M., Sabtcheva S., Courvalin P., Lambert T., 2005, Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49:2949-2953.

Garcia-Armisen T., Servais P., 2004, Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent *in situ* hybridization, *Journal of Microbiological Methods*, 58 :269-279.

Gealt M.A., Chai M.D., Alpert K.B., Boyer J.C., 1985, Transfer of plasmid pBR322 and pBR325 in wastewater from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to the waste disposal system, *Applied and Environmental Microbiology*, 49:836-841.

Geisenberger O., Ammendola A., Christensen B.B., Molin S., Schleifer K.H., Eberl L., 1999, Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and *in situ* identification of the transconjugants, *FEMS Microbiology Letter*, 174:9-17.

Gerba C.P., McLeod J.S., 1976, Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters, *Applied and Environmental Microbiology*, 32(1):114-120.

Ghigo J.M., 2001, Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development, *Nature*, 412(6845):442-445.

Gilbride K.A., Lee D.Y., Beaudette L.A., 2006, Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control, *Journal of Microbiological Methods*, 66:1-20.

Göbel A., McArdell C.S., Suter M.F.-J., Giger W., 2004, Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials a human sulphonamide metabolite and trimetoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 76:4756-4764.

Göbel A., Thomsen A., McArdell C., Alder A.C., Giger W., Theib N., Löffler D., Ternes T.A., 2005(a), Extraction and determination of sulfonamides, macrolides and trimethoprim from sewage sludge, *Journal of Chromatography. A*, 1085(2):179-189.

Göbel A., Thomsen A., McArdell C., Joss A., Giger W., 2005(b), Occurrence and sorption behaviour of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment, *Environmental Science and Technology*, 39:3981- 3989.

Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F. and Moletta R., 1997, Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7):2802-2813.

Goh E.B., Yim G., Tsui W., McClure J., Surette M.G., Davies J., 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:17025-17030

Golet E.M., Xifra I., Siegrist H., Alder A.V., Giger W., 2003, Environmental exposure assessment of fluoroquinolones antibacterial agents from sewage to soil, *Environmental Science and Technology*, 37(15):3243-3249.

Gowland P.C., Slater J.H., 1984. Transfer and stability of drug resistance plasmids in *Escherichia coli* strain K12, *Microbiology and Ecology*, 10:1-13.

Griffith F., 1928, The significance of *pneumococcal* types, *Journal of Hygien*, 27:113-159.

Griffiths, Miller, Suzuki, Lewontin, Gelbart., 1997, Introduction à l'analyse génétique, DeBoeck Université, Torino, 298-304.

Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll S.B., 1999, An Introduction to genetic analysis (7th edition), W.H. Freeman, San Francisco, CA. pp 800.

Güde H., 1979, Grazing by protozoa as selection factor for activated sludge bacteria, *Microbial Ecology*, 5(3):225-237.

Guillaume G., Verbrugge D., Chasseur-Libotte M., Moens W., Collard J., 2000, PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium, *FEMS Microbiology Ecology*, 32:77-85.

Gupta Y.K., Gupta M., Aneja S., Kohli K., 2004, Current drug therapy of protozoal diarrhoea, *Indian journal of Pediatrics*, 71(1):55-58.

Haagensen J.A.J., Hansen S.K., Johansen T., Molin S., 2002, In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements, *FEMS Microbiology and Ecology*, 42:261-268.

Hancock R.E., Speert D.P., 2000, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment, *Drug Resistance Updates*, 3:247-255.

Hausner M., Wuertz S., 1999, High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis., *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3710-3713.

Herold S., Siebert J., Huber A., Schmidt H., 2005, Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3):931-944.

Heuer H., Krögerrecklenfort E., Wellington E.M.H., Egan S., Van Elsas J.D., Van Overbeek L., Collard J-M., Guillaume G., Karagouni A.D., Nikolakopoulou T.L., Smalla K., 2002, Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer, *FEMS Microbiology and Ecology*, 42:289-302.

Heuer H., Szczepanowski R., Schneiker S., Pühler A., Top E.M., Schlüter A., 2004, The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1 β group without any accessory genes, *Microbiology*, 150:3591-3599.

Heuer H., Fox R.E., Top E.M., 2007, Frequent conjugative transfer accelerates adaptation of a broad- host- range plasmid to an unfavorable *Pseudomonasputida* host, *FEMS Microbiology and Ecology*, 59:738-740.

Hill K.E., Fry J.C., Weightman A.J., 1994, Gene transfer in the aquatic environment : persistence and mobilization of the catabolic recombinant plasmid pD10 in the epilithon, *Microbiology*, 140:1555-1563.

Hill K.E., Top E.M., 1998, Gene transfer in soil systems using microcosms, *FEMS Microbiology and Ecology*, 25:319-329.

Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K-L., 1999, Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *The Science of the Total Environment*, 225:109-118.

Hoffman L.R., D'Argenio D.A., MacCoss M.J., Zhang Z., Jones R.A., Miller S.I., 2005, Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation, *Nature*, 436(7054):1171-1175.

Holloway B.W., Morgan A.F., 1986, Genome organization in *Pseudomonas*, *Annual Review of Microbiology*, 40:79-105.

Horii T., Morita M., Muramatsu H., Muranaka Y., Kanno T., Maekawa M., 2003, Effects of mupirocin at subinhibitory concentrations on flagella formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(5):1175-1179.

Huang C.H., Reew J.E., Smeby K., Pinksto K., Sedlak D., 2001, Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis, 11p, *en ligne*:
http://www.ucowr.siu.edu/updates/pdf/V120_A4.pdf

Hughes V.M., Datta N., 1983, Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era, *Nature*, 302:725-726.

Ivins B.E., Welkos S.L., Knudson G.B., Leblanc D.J., 1988, Transposon Tn916 mutagenesis in *Bacillus anthracis*, *Infection and Immunity*, 56:176-181.

Jensen E.C., Schrader H.S., Rieland B., Thompson T.L., Lee K.W., Nickerson K.W., Kokjohn T.A., 1998, Prevalence of broad host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied Environmental Microbiology*, 64:575-580.

Jensen L.B., Agersø Y., Sengeløv G., 2002, Presence of erm genes among macrolide-resistant Gram-positive bacteria isolated from Danish farm soil, *Environment International*, 28:487-491.

Joaquim-Justo C., Pirlot S., Virioux L., Servais P., Thome J.-P., Descy J.-P., 2006, Trophic links in the lowland river Meuse (Belgium) : Assessing the role of bacteria and protozoans in planktonic food webs, *Journal of plankton research*, 28(9):857-870.

Jones G.W., Baines L., Genthner F.J., 1991, Heterotrophic bacteria of the freshwater neuston and their ability to act as plasmid recipients under nutrient deprived conditions, *Microbiology and Ecology*, 22:15-25.

Joss A., Keller E., Alder A.C., Göbel A., McArdell C.S., Ternes T., Siegrist H., 2005, Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment, *Water Research*, 39:3139-3152.

Karthikeyan K.G., Bleam W.F., 2003, Final project report for occurrence of antibiotics in wastewater effluents and their mobility in soils : a case study for Wisconsin. DNR project 169, Wisconsin department of agriculture, trade and consumer protection, 18pp, *en ligne*:
<http://www.dnr.state.wi.us/org/water/dwg.gw/research/reports/169.pdf>

Kelly B.G., Vespermann A., Bolton D.J., 2009, Gene transfer events and their occurrence in selected environments, *Food and Chemical Toxicology*, 47:978-983.

Kessler B., de Lorenzo V., Timmis, K.N., 1992, A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosome of Gram-negative eubacteria: regulation of the *P_m* promoter in the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy, *Molecular and General Genetic*, 233:293-301.

Krone S.M., Lu R., Fox R., Suzuki H., Top E.M., 2007, Modelling the spatial dynamics of plasmid transfer and persistence, *Microbiology*, 153: 2803-2816.

Kuikman P.J., van Elsas J.D., Jansen A.G., Burgers S.L.G.E., Van Veen J.A., 1990, Population dynamics and activity of bacteria and protozoa in relation to their spatial distribution in soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 22 :1063-1073.

Kümmerer K., Al-Ahmad A., Mersch-Sandermann V., 2000, Biodegradability of some antibiotics, elimination of the neotoxicity, and affection of wastewater bacteria in simple test, *Chemosphere*, 40:701-710.

Laboratoire de Bactériologie Clinique de la Faculté de Pharmacie de Lille, Base de données CMI, *en ligne*:

http://pharmacie.univlille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/base_de_donnees/interrogationBD

Laroche E., Pawlak B., Berthe T., Skurnik D., Petit F., 2009, Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France), *FEMS Microbiology and Ecology*, 68(1):118-130.

Lebaron P., Roux V., Lett M.C., Baleux B., 1993, Effects of pili rigidity and energy availability on conjugative plasmid transfer in aquatic environments, *Microbiological Releases*, 2(3):127-33.

Lemarchand K., Berthiaume F., Maynard C., Harel J., Payment P., Bayardelle P., Masson L., Brousseau R., 2005, Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection microarrays, *Journal of Microbiological Methods*, 63:115-126.

Levy S.B., 1998, Multidrug resistance: a sign of the times, *New England Journal of Medicine*, 338:1376-1378.

Levy S.B., Marshall B., 2004, Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, *Nature Medicine*, 10:122-219.

Li D., Yang M., Hu J., Zhang J., Liu R., Gu X., Zhang Y., Wang Z., 2009, Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river, *Environmental Microbiology*, 11(6):1506-1517.

Licht T.R., Christensen B.B., Krogfelt K.A., Molin S., 1999, Plasmid transfer in the animal intestine and other dynamic bacterial populations: the role of community structure and environment. *Microbiology*, 145:2615-2622.

Linares J.F., Gustafsson I., Baquero F., Martinez J.L., 2006, Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:19484-19489.

Lindberg R.H., Olofsson U., Rendhal P., Johansson M.I., Tysklind M., Andersson B.A., 2006, Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and activated sludge treatment of sewage water and digestion sludge, *Environmental Science and Technology*, 40:1042-1048.

Liu C., Yang J.L., Wu G., Zhang S., Li Z. X., Guo J.B., 2010, Estimation of dominant microbial population sizes in the anaerobic granular sludge of a full-scale UASB treating streptomycin wastewater by PCR-DGGE., *World Journal of Microbiology and Biotechnologies*, 26:375-379.

Lorenz M.G., Wackernagel W., 1994, Bacterial gene-transfer by natural genetic transformation in the environment, *Microbiology Reviews*, 58:563-602.

Majewski J., Zawadski P., Pickerill P., Cohan F.M., Dowson C.G., 2000, Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation, *Journal of Bacteriology*, 182:1016-1023.

Marcinek H., Wirth R., Muscholl-Silberhorn A., Gauer M., 1998, *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants, *Applied and Environmental Microbiology*, 64:626-632.

Mackie R.I., Koike S., Krapac I., Chee-Sanford J., Maxwell S., Aminov R.I., 2006, Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities, *Animal Biotechnology*, 17:157-176.

Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M., 2002, Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16:47-51.

Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C., Soulas G., Catroux G., 2001, DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1-6.

Martinez J.L., 2009, The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria, *Proceedings of the Royal Society B*, 276:2521-2530.

Martinez J. L., Sanchez M., Martinez-Solano L., Hernandez A., Garmendia L., Fajardo A., Alvarez-Ortega C., 2009b, Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems, *FEMS Microbiology Reviews*, 33:430-449.

Mazel D., 2006, Integrons: agents of bacterial evolution, *Nature Reviews Microbiology*, 4:608-620.

McArdell C., Molnar E., Suter M.J.-F., Giger W., 2003, Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the glatt valley watershed, Switzerland, *Environmental Science and Technology*, 37:5479-5485.

- McFarland J.W., Berger C.M., Froshauer S.A., Hayashi S.F., Hecker S.J., Jaynes B.H., Jefson M.R., Kamicker B.J., Lipinski C.A., Lundy K.M., Reese C.P., Vu C.B., 1997,** Quantitative structure activity relationship among macrolide antibacterial agents: In vitro and in vivo potency against *Pasteurella multocida*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(9):1340-1346.
- McGowan J.E., 2006,** Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum, *American Journal of Medicine*, 119:29-36.
- McGrady-Steed J., Morin P.J., 2000,** Biodiversity, density compensation, and the dynamics of populations and functional groups, *Ecology*, 81(2):361-373.
- McManus P.S., Stockwell V.O., Sundin G.W., Jones A.L., 2002,** Antibiotic use in plant agriculture, *Annual Review of Phytopathology*, 40:443-465.
- Meier P., Wackernagel W., 2003,** Mechanisms of homology-facilitated illegitimate recombination foreign DNA acquisition in transformable *Pseudomonas stutzeri*, *Molecular Microbiology*, 48:1107-1118.
- Merlin C., Springael D., Toussaint A., 1999,** *Tn4371*: a modular structure encoding a phage-like integrase, a *Pseudomonas*-like catabolic pathway, and RP4/Ti-like transfer functions, *Plasmid*, 41:40-54.
- Merlin C., Mahillon J., Nesvera J., Toussaint A., 2000,** Gene recruiters and transporters: the Modular Structure of Bacterial Mobile Elements, pp363-409, *In The Horizontal Gene Pool*, Thomas C.M. (ed), Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Miller, J.H., 1992,** A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Mølbak L., Licht T.R., Kvist T., Kroer N., Anderse S.R., 2003,** Plasmid transfer from *Pseudomonas putida* to the indigenous bacteria on alfalfa sprouts: characterization, direct quantification, and *in situ* location of transconjugants cells, *Applied and Environmental Microbiology*, 69:5536-5542.
- Molin S., Tolker-Nielsen T., 2003,** Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure, *Current Opinion in Biotechnology*, 14:255–261.
- Moraga M.R., Santander P.E., Arias C.T., Méndez A.F., 2007,** Integrons and their relationship with resistance phenotype in Gram negative bacilli isolated in the Hospital Torres Galdames, Iquique, Chile, *Revista Chilena de Infectologia*, 24(5):384-390.
- Muela A., Pocino M., Arana I., Justo J.I., Iriberry J., Barcina I., 1994,** Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 60:4273-4278.
- Nancharaiah Y. V., et al., 2003,** Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid *Applied and Environmental Microbiology*, 69:4846-4852.

Nordmann P., Poirel L., 2005, Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56:463-469.

Nüsslein K., Maris D., Timmis K., Dwyer D.F., 1992, Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* spp. Introduced into activated sludge microcosms, *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3380-3386.

Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E. A., 2000, Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation, *Nature*, 405:299-304.

Ong C.L.Y., Beatson S.A., McEwan A.G., Schembri M.A., 2009, Conjugative plasmid transfer and adhesion dynamics in an *Escherichia coli* biofilm, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21):6783-6791.

Ortega Y.R., Eberhard M.L., 2008, Protozoan diseases : *Cryptosporidiosis, Giardiasis*, and other intestinal protozoan diseases, p. 354-356, In *International Encyclopedia of Health*, Heggenhougen K., Quah S. (eds), Presses Académiques, Bergen.

Osborn A.M., Böltner D., 2002, When phage, plasmids, and transposons collide : genomics islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum, *Plasmid*, 48:202-212.

Oswald A.T., Macleod C.M., McCarty M., 1944, Studies on the chemical Nature of the Substance inducing Transformation of Pneumococcal Types, *Journal of Experimental Medicine*, 79(2):137-158.

Ozgumus O.B., Sandalli C., Sevim A., Celik-Sevim E., Sivri N., 2009, Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey, *Journal of Microbiology*, 47(1):19-27.

Pansegrau W., Lanka E., Barth P.T., Figurski D.H., Guiney D.G., Haas D., Helinski D.R., Schwab H., Stanisich V.A., Thomas C.M., 1994, Complete nucleotide sequence of Birmingham Incpa plasmids : compilation and cooperative analysis, *Journal of Molecular Biology*, 239:623-663.

Park S.F., Stewart G.S., 1990, High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells, *Gene*, 94:129-132.

Pei R.T., Kim S.C., Carlson K.H., Pruden A., 2006, Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG), *Water Research*, 40:2427-2435.

Peng J.B., Yan W.M., Bao X.Z., 1994, Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus*, *Journal of Bacteriology*, 176(10):2892-7.

Perkins C.D., 1994, Retrotransfer by mercury-resistance conjugative plasmids isolated from a freshwater environment. Ph.D. Thesis, University of Wales, Cardiff, UK.

Pesci E.C., Milbank J.B.J., Pearson J.P., McKnight S., Kende S.A., Greenberg E.P., Iglewski H., 1999, Quinolone signalling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 96:11229-11234.

Peters J.E., Thate, T.E., Craig N.L., 2003, Definition of the *Escherichia coli* MC4100 Genome by Use of a DNA Array, *Journal of Bacteriology*, 165(6):2017-2021.

Porteous L.A., Sleider R.J., Watrud L.S., 1997, An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications, *Molecular Ecology*, 6:787-791.

Prasher D.C., 1995, Using GFP to see the light, *Trends in Genetic*, 11(8):320-323.

Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys JP., 2006, Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, *Science*, 313:89-92.

Pukall R., Tschäpe H., Smalla K., 1996, Monitoring the spread of broad host and narrow host range plasmids in soil microcosms, *FEMS Microbiology and Ecology*, 20:53-66.

Purohit H.J., Kapley A., Moharikar A.A., Narde G., 2003, A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants, *Journal of Microbiological Methods*, 52:315-323.

Puyet A., Greenberg B., Lacks S.A., 1990, Genetic and structural characterization of EndA – a membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*, *Journal of Molecular Biology*, 213:727-738.

Qiagen, 2002, Protocole de purification d'ADN à partir de selles pour le dépistage d'agents pathogènes in Protocoles du kit QIAamp® DNA stool Mini, pp 8-11. en ligne : http://www1.qiagen.com/FR/literature/handbooks/PDF/3000011_HBOAStool_012002FR.pdf

Quinn J.P., 1998, Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting Gram-negative pathogens, *Clinical Infectious Diseases*, 27:117-124.

Rowe-Magnus D.A., Guerout A. M., Biskri L., Bouige P., Mazel D., 2001, Comparative analysis of superintegrations: engineering extensive genetic diversity in the Vibrionaceae, *Genome Research*, 13:428-442.

Salmond G.P., Welch M., 2008, Antibiotic resistance: adaptive evolution, *Lancet*, 372:97-103.

Salyers A.A., Shoemaker N.B., Li L.Y., 1995a, In the driver's seat : the bacteroides conjugative transposons and the elements they mobilize, *Journal of Bacteriology*, 177(20):5727-5731.

Salyers A.A., Shoemaker N.B., Stevens A.M., Ly L., 1995b, Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements, *Microbiological Reviews*, 59:579-590.

Salyers A.A., Amabile-Cuevas C.F., 1997, Why are antibiotics resistance genes so resistant to elimination? Minireview, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 41(11):2321-2325.

Salyers A.A., Gupta A., Wang Y., 2004, Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes, *Trends in Microbiology*, 12:412-416.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sandaa R.-A., Enger Ø., 1994, Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance, *Applied and Environmental Microbiology*, 60:4234-4238.

Schlüter A., Heuer H., Szczepanowski R., Forney L.J., Thomas CM., Pühler A., Top E.M., 2003, The 64 508 bp IncP-1 β antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 β group, *Microbiology*, 149:3139-3153.

Schlüter A., Heuer H., Szczepanowski R., Poler S.M., Schneiker S., Pühler A., Top E.M., 2005, Plasmid pB8 is closely related to the prototype IncP-1 plasmid R751 but transfers poorly to *Escherichia coli* and carries a new transposon encoding a small multidrug resistance efflux protein, *Plasmid*, 54(2):135-148.

Schwarz F., Perreten V., Teuber M., 2001, Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25, *Plasmid*, 46:170-187.

Showsh S.A., Andrews R.E.Jr., 1992, Tetracycline enhances Tn916-mediated conjugal transfer, *Plasmid*, 28:213-224.

Sibille I., Sime-Ngando T., Mathieu L., Block J. C., 1998, Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1):197-202.

Siguié P., Perochon J., Lestrade L., Mahillon J., Chandler M., 2006, ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences, *Nucleic Acids Research*, 34:32-36.

Singer R.S., Finch R., Wegener H.C., Bywater R., Walters J., Lipsitch M., 2003, Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings, *Lancet Infect Dis*, 3:47-51.

Smalla K., Sobecky P.A., 2002, The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches, *FEMS Microbiology and Ecology*, 42:165-175

Sørensen S.J., Schyberg T., Rønn R., 1999, Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil, *Applied Soil Ecology*, 11(1):79-90.

Sørensen S.J., Bailey M., Hansen L.H., Kroer N., Wuertz S., 2005, Studying plasmid horizontal transfer *in situ* : a critical review, *Nature Microbiology Review*, 3:700-710.

Sota M., Top E.M., 2008, Horizontal gene transfer mediated by plasmids. In: *Plasmids: Current Research and Future Trends*, Lipps G. (ed),. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 111-181.

Springael D., Kreps S., Mergeay M., 1993, Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5, *Journal of Bacteriology*, 175(6):1674-1681.

Springael D., Top E.M., 2004, Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies, *Trends Microbiology*, 12:53-58.

Stockes H.W., Hall R.M., 1989, A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons, *Molecular Microbiology*, 3(12):1669-1683.

Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.-D., Rodrigues S.V., Baumann W., 1999, Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil, *The Science of the Total Environment*, 225:135.

Szczepanowski R., Krahn I., Pühler A., Schlüter A., 2004a, Different molecular rearrangements in the integron of the IncP-1 β resistance plasmid pB10 isolated from a wastewater treatment plant result in elevated β -lactam resistance levels, *Archives of Microbiology*, 182:429-435.

Szczepanowski R., Krahn I., Linke L., Goesmann A., Pühler A., Schlüter A., 2004b, The antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system, *Microbiology*, 150:3613-3630.

Szczepanowski R., Braun S., Riedel V., Schneiker S., Krahn I., Pühler A., Schlüter A., 2005, The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions, *Microbiology*, 151:1095-1111.

Tatum E.L., Lederberg J., 1947, Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 53:673-684.

Tauch A., Schlüter A., Bischoff N., Goesmann A., Meyer F., Pühler A., 2003, The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 β backbone loaded with a chromate resistance transposon, the strA-strB streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene bla(NPS-1), and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family, *Molecular Genetic and Genomics*, 268(5):570-584.

Ternes T.A., Janex-Habibi M.-L., Knacker T., Kreuzinger N., Siegrist H., 2004, Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse, POSEIDON, 58pp, en ligne: <http://www.euposeidon.com>

Thiele-Bruhn S., 2003, Pharmaceutical antibiotic compounds in soils- a review, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166:145-167.

- Thomas C.M.**, 2000, The Horizontal Gene Pool, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Thomas C.M., Nielsen K.M.**, 2005, Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria, *Nature Reviews, Microbiology*, 3:711-721.
- Tolls J.**, 2001, Sorption of veterinary pharmaceuticals in soil : A review, *Environmental Science and Technology*, 35:3397-3406.
- Top E., Mergeay M., Springael D., Verstraete W.**, 1990, Gene escape model : transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 56 : 2471-2479.
- Top E.M., Springael D.**, 2003, The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds, *Current opinion in Biotechnology*, 14:262-269.
- Torres O.R., Korman R.Z., Zahler S.A., Dunny G.M.**, 1991, The conjugative transposon Tn925: enhancement of conjugal transfer by tetracycline in *Enterococcus faecalis* and mobilization of chromosomal genes in *Bacillus subtilis* and *E. faecalis*, *Molecular and General Genetics*, 225:395-400.
- Torvisk V., Goksøyr J., Daae F.L.**, 1990, High diversity in DNA of soil bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 56:782-787.
- Townsend J.P., Nielsen K.M., Fisher D.S., Hartl D.L.**, 2003, Horizontal acquisition of divergent chromosomal DNA in bacteria : effects of mutator phenotypes, *Genetics*, 164:13-21.
- Trieu-Cuot P., Derlot E., Courvalin P.**, 1993, Enhanced conjugative transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, *FEMS Microbiology Letters*, 109:19-23.
- Tsui W.H.W., Yim G., Wang H.H., McClure J.E., Surette M.G., Davies J.**, 2004. Dual effects of MLS antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome, *Chemical Biology*, 11:1-20.
- Van Elsas J. D.**, 1992, Antibiotic resistance gene transfer in the environment : an overview, p. 17-39, In *Genetic Interactions among Microorganisms in the Natural Environment*, Wellington E.M., van Elsas J.D.(eds), Pergamon Press, Oxford.
- Van Elsas J. D., Fry J., Hirsch P., Molin S.**, 2000, Ecology of plasmid transfer and spread, p. 171-206, In *The horizontal gene pool*, Thomas C.M.(ed), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, the Netherlands.
- Van Elsas J. D., Boersma H., Smit E.**, 2004, Detection of bacterial conjugation in soil, p. 1141-1150, In *Molecular microbial ecology manual, 2nd ed.*, Kowalchuk G.A., de Bruijn F.J., Head I. M., Akkermans A. D., van Elsas J. D.(eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Van Overbeek L.S., Wellington E.M.H., Egan S., Smalla K., Heuer H., Collard J-M., Guillaume G., Karagouni A.D., Nikolakopoulou T.L., Van Elsas J.D.**, 2002, Prevalence of

streptomycin-resistance genes in bacterial populations in European habitats, *FEMS Microbiology and Ecology*, 42:277-288.

Van Veen J.A., Kuikman P.J., van Elsas J.D., 1994, Modelling microbial interactions in soil : preliminary considerations and approaches, p.29-46, *In Environmental Gene Release*, Bazin M.J., Lynch J.M.(eds), Chapman and Hall, London.

Verhoef J., Jansen W.T.M., Van der Bruggen J.T., Fluit A.C., 2004, A general introduction to the field of antimicrobials and antimicrobial resistance : the past and the present *in Resistance : a sensitive issue*, The European roadmap to combat antimicrobial resistance, 21-29, 206p.

Wang Y., Rotman E.R., Shoemaker N.B., Salyers A.A., 2005, Translational control of tetracycline resistance and conjugation in the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT, *Journal of Bacteriology*, 187:2673-2680.

Watanabe T., 1963, Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria, *Bacteriological Review*, 27:87-115.

Watanabe T., Nishida H., Ogata C., Arai T., Sato S., 1964, Episome-mediated transfer of drug resistance in *enterobacteriaceae* VII. Two types of naturally occurring factors, *Journal of Bacteriology*, 88:716- 726.

Weigel L.M., Clewell D.B., Gill S.R., Clark N.C., McDougal L.K., Flannagan S.E., Kolonay J.F., Shetty J., Killgore G.E., Tenover F.C., 2003, Genetic analysis of a high-level vancomycin resistant isolate of *Staphylococcus aureus*, *Science*, 302:1569-1571.

Werner G., Bartel M., Wellinghausen N., Essig A., Klare I., Witte W., Poppert S., 2007, Detection of mutations conferring resistance to linezolid in *Enterococcus* spp. by fluorescence *in situ* hybridization, *Journal of Clinical Microbiology*, 45:3421-3423.

WHO, 2000, Overcoming antibiotic resistance, World Health Organization Report in Infectious Diseases, World Health Organization, Geneva.

Yim G., Huimi Wang H., Davies J., 2006, The truth about antibiotics, *International Journal of Medical Microbiology*, 296:163-170.

Yu Z., Mohn W.W., 1999, Killing two birds with one stone : simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass, *Canadian Journal of Microbiology*, 45:269-272.

Zaneveld J.R., Nemergut D.R., Knight R., 2008, Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns, *Microbiology*, 154:1-15.

Zhang T., Fang H.H.P., 2006, Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70:281-289.

Zhang X.X., Zhang T., Fang H.H.P., 2009, Antibiotic resistance genes in water environment, *Applied Microbiology and Biotechnologies*, 82:397-414.

Zinder N.D., Lederberg J., 1952, Genetic exchange in *Salmonella*, *Journal of Bacteriology*, 64:679-699.

Zhong X., Jaroslaw E.K., Top E.M., Krone S.M., 2010, Accounting for mating pair formation in plasmid population dynamics, *Journal of Theoretical Biology*, 262(4): 711-719.

Annexes

Annexe 1 : Protocoles d'extraction et de purification d'ADN totaux de matrices environnementales testés

Protocole 1 : Sonication et extraction d'ADN par phénol/ chloroforme/ alcool isoamylique

Cette technique a été développée à partir des résultats obtenus par Bourrain et *al.*, (1999) sur des échantillons de boues activées.

Après homogénéisation, l'échantillon est soumis à une sonication pendant 15 minutes à une puissance de 52 W (sonicateur, sonde 19 mm) et agité toutes les trois minutes. L'échantillon dispersé est lavé par ajout de quatre volumes d'une solution saline-EDTA (0,5 M NaCl, 0,01 M EDTA pH 8,0) et centrifugé pendant 10 minutes à 2 800 x g. Le culot est ensuite resuspendu dans 2,4 mL de tampon SFM (10 mg lysozyme, 10 mL de solution saline-EDTA) et incubé à température ambiante pendant 30 minutes. Un volume de 800 µL de Sodium Disulfite (SDS) 10% et 1 mg/mL de protéinase K sont ensuite ajoutés à l'échantillon qui est mis en incubation à 37°C pendant deux heures sous agitation (160 rpm).

L'ADN est extrait des échantillons par l'ajout d'un volume de phénol suivi d'une centrifugation pendant 15 minutes à 2 800 x g. La phase aqueuse est récupérée et transférée dans un tube propre. 4 mL d'un mélange de chloroforme/ alcool isoamylique (24 :1) sont ajoutés et les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 2 800 x g. Cette étape d'extraction par le chloroforme et l'alcool isoamylique est répétée une seconde fois.

L'ADN est alors précipité par l'ajout d'un volume d'isopropanol suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 2 800 x g. 4 mL d'éthanol 70% froid sont ajoutés au culot qui est remis en solution puis centrifugé à nouveau pendant 10 minutes à 2 800 x g. L'éthanol est ensuite éliminé et les traces persistantes sont évaporées par incubation à 37°C pendant 45 minutes des tubes ouverts. Le culot d'ADN est ensuite remis en suspension dans un volume de 50µL d'eau ultrapure et laissé toute une nuit à température ambiante pour favoriser la resolubilisation. La solution d'ADN est conservée à – 20°C jusqu'à utilisation.

Protocole 2 : Extraction d'ADN par la procédure GES (Guanidine thiocyanate/ EDTA / N-lauryl-Sarcosyl)

Selon la technique rapportée par Lemarchand et *al.*,(2005), l'échantillon est mélangé à 4 volumes de tampon TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) et centrifugé pendant 15 minutes à 2 800 x g. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 0,7 volume de tampon TE 1X et 3,3 volumes de tampon de lyse GES (500 mM guanidine

thiocyanate, 100 mM EDTA, 0,5% (v/w) N-lauryl-Sarcosyl). Les solutions sont incubées à température ambiante pendant 90 minutes. Les impuretés sont précipitées par l'addition de 1,7 volumes d'acétate d'ammonium froid 4M et incubation du mélange sur la glace pendant 10 minutes.

Un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25: 24: 1) est ajouté. Les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 2 800 x g et le surnageant est récupéré. Cette étape est répétée jusqu'à ce que l'interface blanche ait complètement disparu dans le mélange.

L'ADN est précipité par incubation pendant une heure à -20°C après ajout de 0,5 volume d'isopropanol aux fractions de surnageant récupérées. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 2 800 x g. 4 mL d'éthanol 70% glacé sont ajoutés au culot d'ADN qui est remis en suspension puis centrifugé pendant 15 minutes à 2 800 x g. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est ensuite séché à 37°C pendant 45 minutes afin d'évaporer les traces d'éthanol persistantes. Le culot d'ADN est ensuite remis en suspension dans un volume de 50 µL d'eau ultrapure et laissé toute une nuit à température ambiante pour favoriser la resolubilisation. La solution d'ADN est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

Protocole 3 : Procédure de lyse par chocs thermiques et solution de lyse lysozyme-SDS

Cette technique est basée sur celle décrite par Bourrain et *al.*, (1999). Selon ce protocole, un volume de tampon TENP (50 mM Tris base, 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mg/mL polyvinylpyrrolidone) est ajouté à l'échantillon qui est soumis ensuite trois fois à une alternance de 3 minutes d'incubation sur glace et 2 minutes d'incubation dans un bain marie à 55°C. Deux volumes de solution de lyse (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, 15 mg/mL de lysozyme, pH 8,0) sont ajoutés au mélange qui est incubé à 37°C pendant 2 heures sous agitation (160 rpm). Un égal volume d'une solution de sodium dodecylsulfate (100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, 10% (w/v) SDS, pH 8,0) est ensuite ajouté. La solution est mélangée à l'aide d'un vortex afin d'obtenir une émulsion qui est ensuite centrifugée à 12 000 x g pendant 10 minute à 4°C.

Le surnageant est prélevé. Un volume équivalent de phénol saturé au tampon TE est ajouté, mélangé puis centrifugé à 2 800 x g pendant 15 minutes à température ambiante. La phase aqueuse est prélevée et transférée dans un tube propre.

L'ADN est extrait de la phase aqueuse par ajout d'un volume d'un mélange de chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Après homogénéisation grâce à un vortex, une étape de centrifugation est réalisée à 2 800 x g pendant 15 minutes à température ambiante. Cette étape d'extraction par chloroforme/alcool isoamylique est répétée. L'ADN est ensuite précipité par

addition d'un volume d'isopropanol pur. Après centrifugation à 2 800 x g pendant 15 minutes à température ambiante, le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est purifié par ajout d'éthanol 70% glacial. Le culot est remis en solution et récupéré par centrifugation à 2 800 x g pendant 15 minutes à température ambiante. L'alcool est éliminé et le culot d'ADN est séché à 37°C pendant une heure. L'ADN est remis en solution dans 100 µL d'eau ultrapure et mis en incubation à température ambiante pendant une nuit afin d'améliorer la resolubilisation. La solution d'ADN est conservée à – 20°C jusqu'à utilisation.

Protocole 4 : Séparation par broyage mécanique avec microbilles et purification par acétate d'ammonium

Selon le protocole de Yu et Mohn (1999), l'échantillon de boue est centrifugé à 16 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Deux grammes de billes de verres (diamètre 1 mm) et 1 mL de tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 3% (w/v) SDS, RNase A (10 µg/mL)) sont ajoutés à 500 mg de la boue lavée. Les tubes sont agités horizontalement à l'aide d'un vortex (Bioblock scientifique Top-Mix 94323) à vitesse maximale pendant 3 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 16 000 x g pendant 3 minutes à température ambiante et la fraction de surnageant est récupérée. Pour augmenter la libération d'ADN de l'échantillon, la lyse par le traitement de broyage à l'aide des microbilles est répétée sur le culot de boues et les fractions de surnageant récupérées sont mélangées les unes aux autres.

Les impuretés sont précipitées par addition d'acétate d'ammonium 2 M. Le mélange est ensuite mis en incubation pendant 5 minutes sur de la glace, puis centrifugé à 16 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante et les fractions de surnageant sont collectées. L'étape de purification est répétée une seconde fois sur les fractions de surnageant collectées afin d'éliminer les impuretés persistantes.

Les acides nucléiques sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol à la fraction de surnageant qui est centrifugée à 16 000 x g pendant 15 minutes à température ambiante. Le culot d'acides nucléiques est nettoyé par ajout d'éthanol 70% puis centrifugé à 16 000 x g pendant 5 minutes à température ambiante. Les fractions de surnageant sont éliminées et les traces d'éthanol sont évaporées par incubation des échantillons à 37°C pendant une heure. L'ADN est remis en solution dans 100 µL d'eau ultrapure et mis en incubation à température ambiante pendant une nuit afin d'améliorer la resolubilisation. La solution d'ADN est conservée à – 20°C jusqu'à utilisation.

Protocole 5 : Séparation par broyage mécanique avec microbilles et purification par mélange phénol/chloroforme/ alcool isoamylique

Selon la technique développée par Guillaume et *al.*, (2000), les échantillons sont centrifugés à 16 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot obtenu est remis en solution dans 0,6 mL de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 50 mM, SDS 3%) et transféré dans un tube stérile de 2 mL contenant des microbilles de verre de 1 mm de diamètre et à 0,6 mL de phénol (saturé au Tris-HCl)/chloroforme/ alcool isoamylique (50 :49 :1). Les tubes sont agités horizontalement à l'aide d'un vortex (Bioblock scientifique Top-Mix 94323) à vitesse maximale pendant 2 minutes et incubés 30 minutes à 65°C. Les échantillons sont centrifugés à 16 000 x g, pendant 15 minutes à température ambiante. La fraction de surnageant est transférée dans un tube propre stérile de 1,5 mL.

Les acides nucléiques sont précipités par ajout de 2 volumes d'éthanol en présence d'acétate de potassium 0,3 M. Les échantillons sont incubés 1h à -80°C, puis centrifugés à 16 000 x g pendant 15 minutes à température ambiante. Après élimination du surnageant le culot formé par les acides nucléiques est lavé par addition de deux volumes d'éthanol 70% froid. L'éthanol est évaporé par incubation des échantillons à 37°C pendant une heure. L'ADN est remis en solution dans 100 µL d'eau ultrapure et mis en incubation à température ambiante pendant une nuit afin d'améliorer la resolubilisation. La solution d'ADN est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

Protocole 6 : Séparation par broyage aux microbilles et purification finale sur sépharose 4B

Selon la technique développée en rhizosphère par Martin-Laurent et *al.*, (2001), une masse de 250 mg d'échantillon est pesée et mise dans un tube avec 500 mg de microbilles de verre de 0,1 mm de diamètre et 2 billes de 1 mm de diamètre. Un volume de 1 mL de tampon de lyse (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 100 mM pH 8 ; NaCl 100 mM, PVPP 1%, SDS 2%) est ajouté et les tubes sont agités horizontalement à l'aide d'un vortex (Bioblock scientifique Top-Mix 94323) à vitesse maximale pendant 30 secondes. Les débris sont éliminés par centrifugation à 14 000 x g pendant 1 minute à 4°C.

Le surnageant récupéré est mélangé avec un 1/10 de volume d'acétate de sodium 5 M pH 5,5 et incubé 10 minutes sur de la glace. Les impuretés précipitées sont éliminées par centrifugation à 14 000 x g pendant 5 minutes à température ambiante et le surnageant est récupéré. Un volume d'isopropanol froid est ajouté et le mélange est incubé pendant 15 minutes à -20°C. Après centrifugation à 13 000 x g pendant 30 minutes, le surnageant est

éliminé et le culot est lavé avec de l'éthanol froid puis centrifugé à 13 000 x g pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les traces d'éthanol sont évaporées par incubation des échantillons à 37°C pendant une heure. L'ADN est remis en solution dans 50 µL d'eau ultrapure et mis en incubation à température ambiante pendant une nuit afin d'améliorer la resolubilisation.

L'échantillon d'ADN est déposé sur une mini colonne de sépharose 4B et le système est centrifugé à 1 100 x g pendant 2 minutes à température ambiante. La fraction filtrée est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

Protocole 7 : Neutralisation des acides humiques par sels d'aluminium, séparation par broyage mécanique avec microbilles et purification par mélange chloroforme/alcool isoamylique

Selon la technique développée par Dong et *al*, (2005) les acides humiques, inhibiteurs connus des réactions d'amplification d'ADN dans les PCR sont neutralisés grâce à des sels d'aluminium.

Une masse de 300 mg d'échantillon est mélangée à 300 µL de tampon phosphate (NaH_2PO_4 0,1 M ; NaHPO_4 0,1 M, pH 6,6). Un volume de 200 µL de solution de sulfate d'aluminium 100 mM est ajouté au mélange. Le tout est mélangé grâce à un vortex pendant deux minutes et le pH est ensuite ajusté à 8 par ajout de 100 µL de NaOH 1 M. Cette étape de précipitation des acides humiques et des acides nucléiques extracellulaires est suivie par une lyse cellulaire et une extraction d'ADN comme suit.

Quatre microbilles de verre de deux millimètres de diamètre sont ajoutées et l'échantillon est mélangé par agitation grâce à un vortex. Un volume de 250 µL de tampon SDS (NaCl 100 mM, Tris-HCl 500 mM pH 6, SDS 10% (poids/volume)). L'ensemble est agité horizontalement à vitesse maximale à l'aide d'un vortex pendant 10 minutes. Après centrifugation à 10 000 x g pendant 30 secondes à température ambiante, le surnageant est récupéré puis mélangé à 250 µL d'un mélange chloroforme/ alcool isoamylique (24 :1). L'échantillon est alors incubé pendant 5 minutes dans de la glace puis centrifugé à 10 000 x g pendant 1 minute. Le surnageant est récupéré et mélangé à 0,5 volume d'acétate de sodium 7,5 M et un volume d'isopropanol. Le mélange est incubé pendant 15 minutes à -20°C et centrifugé à 12 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot d'acides nucléiques est lavé trois fois à l'éthanol 70% puis séché pendant une heure à 37°C. L'ADN est remis en solution dans 100 µL d'eau ultrapure et mis en incubation à température

ambiante pendant une nuit afin d'améliorer la resolubilisation. La solution d'ADN est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

Protocole 8 : Extraction d'ADN dans les échantillons de boues avec le Kit QIAamp[®] DNA Stool

L'ADN est extrait des échantillons de boues activées selon la procédure recommandée pour la purification d'ADN à partir d'échantillons de selles pour le dépistage d'agents pathogènes. Ce protocole élaboré par Qiagen[®] (Qiagen ref.51504, 2002) est dans notre cas optimisé par une augmentation du temps d'incubation des étapes de lyse (temps d'incubation à 95°C de 5 minutes augmenté à 10 minutes) et d'adsorption des inhibiteurs sur la résine InhibitEX[®] (temps de contact avec la résine de 1 minute augmenté à 3 minutes).

Le protocole du kit est réalisé comme suit : Une masse d'environ 210 mg d'échantillon est mise dans un microtube de 2 mL. Un volume de 1,4 mL de tampon ASL est ajouté à l'échantillon et le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 1 minute puis incubé pendant 10 minutes à 95°C . La suspension est homogénéisée toutes les 2 minutes.

La suspension lysée est homogénéisée grâce à un vortex pendant 15 secondes puis centrifugée 1 minute à $20\,000 \times g$ afin de culotter les particules.

Un volume de 1,2 mL de surnageant est transféré dans un nouveau tube. Un comprimé d'InhibitEX est ajouté et l'échantillon est immédiatement mélangé par vortex pendant 1 minute jusqu'à complète dissolution et l'échantillon est incubé 3 minutes à température ambiante afin de permettre aux inhibiteurs de se fixer sur la résine InhibitEX. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 3 minutes à $20\,000 \times g$ afin de culotter les inhibiteurs fixés sur l'InhibitEX.

Le surnageant est transféré dans un nouveau tube de 1,5 mL et centrifugé pendant 3 minutes à $20\,000 \times g$. Un volume de 200 μL de surnageant est prélevé et mélangé à 15 μL de Protéinase K et 200 μL de tampon AL. L'ensemble est homogénéisé grâce à un vortex pendant 15 secondes puis incubé 10 minutes à 70°C . Un volume de 200 μL d'éthanol 100% est ajouté au lysat et la suspension est homogénéisée.

La totalité du lysat obtenu est déposé sur une colonne QIAamp soumise à une centrifugation pendant 1 minute à $20\,000 \times g$. La colonne QIAamp est transférée dans un nouveau tube collecteur. Un volume de 500 μL de tampon AW1 est déposé sur la colonne qui est centrifugée pendant 1 minute à $20\,000 \times g$. La colonne est transférée dans un nouveau tube collecteur et 500 μL de tampon AW2 sont déposés. La colonne est centrifugée pendant 3 minutes à $20\,000 \times g$. La colonne est transférée dans un nouveau tube et l'ADN est élué par

ajout de 200 µL de tampon AE déposés directement au centre de la colonne. La colonne est incubée 5 minutes à température ambiante avant d'être centrifugée pendant 1 minute à 20 000 x g. L'échantillon d'ADN purifié est conservé à -20°C.

Protocole 9 : Extraction d'ADN selon la technique de Purohit *et al.*, (2003)

Selon la méthode décrite par Purohit *et al.*, (2003), une masse de 70 mg d'échantillon est lavée à l'eau ultrapure centrifugée à 2 500 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot est resuspendu dans 250 µL de Tris 50 mM pH 9. La solution est incubée à 50 °C pendant 15 minutes et homogénéisée par vortex toutes les 3 minutes. L'échantillon est centrifugé à 2 500 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot est resuspendu dans 250 µL d'eau ultrapure puis centrifugé à 2 500 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot lavé est resuspendu dans 200 µL de Tween 20 0,01 % et la solution est incubée à 50 °C pendant 15 minutes. Après centrifugation à 12 000 x g pendant 5 minutes à température ambiante le culot est resuspendu dans 200 µL de Tween 20 à 0,01%, 300 µL d'acétone et 1200 µL de pétrole éther. Le mélange est agité sur table d'agitation à 160 rpm pendant 15 minutes à 30°C.

Après centrifugation à 12 000 x g pendant 15 minutes à température ambiante, le culot subit un lavage à l'eau ultrapure. Le culot lavé est resuspendu dans 50 µL d'eau ultrapure et 50 µL de NaOH 1N puis incubé pendant 30 minutes à température ambiante. La solution est neutralisée par addition de 100 µL de Tampon Tris 1M et le volume est ajusté à 1 mL par addition d'eau ultrapure. L'échantillon d'ADN purifié est conservé à -20°C.

Protocole 10 : Extraction d'ADN par précipitations différentielles des contaminants et purification sur microconcentrateur

Selon la méthode de Porteous *et al.* (1997), une masse de 500 mg d'échantillon est mélangée à 925 µL de tampon de lyse SDS et 75 µL de Guanidine isothiocyanate 5 M. Le mélange est ensuite soumis à une sonication (bain transsonic digital) de 180 W pendant 2 minutes. L'échantillon dispersé est incubé pendant 90 minutes à 68°C et centrifugé à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Un volume de 600 µL de surnageant est récupéré et mélangé à 75 µL d'acétate de potassium 5 M et 250 µL de Polyéthylène glycol 8000 40%. La précipitation est favorisée par incubation du mélange pendant 1 heure à -20°C. L'échantillon est centrifugé à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C.

Le surnageant est éliminé et le culot dissous dans 900 µL de tampon CTAB 2X (2% hexadecyltrimethylammonium bromide, NaCl 1,4 M, Na₂EDTA 0,1 M), soumis à une

sonication (bain de sonication transsonic digital) de 180 W pendant 1 minute puis incubé pendant 15 minutes à 68°C. Un volume de 900 µL de chloroforme est ajouté et ce mélange, après avoir été homogénéisé avec précaution, est centrifugé à 13 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante.

La phase aqueuse est récupérée et l'ADN est précipité par ajout de 1mL d'isopropanol et incubation du mélange pendant 15 minutes à -20°C. L'échantillon est centrifugé à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant éliminé. Le culot est dissous dans 450 µL d'acétate d'ammonium 2,5 M et 1 mL d'éthanol 95%, incubé pendant 15 minutes à 4°C puis centrifugé à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C.

Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 450 µL de tampon TAE (Tris acétate 0,04 M pH 8 ; Na₂EDTA 0,001 M). La solution obtenue est déposée sur microconcentrateur microcon-100 (Amicon, Beverly, USA). Le système est centrifugé à 1 000 x g pendant 5 minutes. La colonne est lavée deux fois par ajout de tampon de 450 µL de tampon TAE et une fois par ajout de tampon TE (0,01 M Tris-HCl pH 8; Na₂EDTA 0,001 M). Le microconcentrateur est inversé puis l'ADN est élué par ajout de tampon TE et centrifugation à 500 x g pendant 5 minutes. La solution d'acides nucléiques purifiés est conservée à -20°C.

Annexe 2 : Calcul du nombre de copies de génome contenu dans 1 µg d'ADN génomique de DH5α

Grâce aux travaux de Peters et *al.* (2003), la taille du génome de *E. coli* DH5α peut être estimée. DH5α est proche de *E. coli* MC4100 dont la séquence est référencée sur GENBANK sous le numéro NC000913. Le génome de DH5α équivaut à celui de MC4100 mais de taille inférieure engendrée par des pertes de matériel génétique de 97239 pb, 15203 pb, 6678 pb et 1018 pb soit un total de 120138 pb perdues.

La taille du génome de MC4100 est égale à 4 639 675 pb.

Ainsi la taille du génome de DH5α est égale à $4\,639\,675 - 120\,138 = 4\,519\,537$ pb.

Le poids moyen d'une paire de bases = 650 da.

Soit une copie de génome de DH5α : $4\,519\,537 \times 650 = 4,88 \cdot 10^{-6}$ ng.

D'où il vient que 1 µg d'ADN génomique de DH5α contient $2,1 \cdot 10^8$ copies de génome.

Annexe 3 : Calcul du nombre de copies de plasmide contenu dans 1 µg d'ADN de pB10

La taille du plasmide pB10 est égale à 64,508 kb.

On sait que 1 µg d'ADN de 1kb = 1,5 pmol, d'où 1µg d'ADN de pB10 = 0,023 pmol.

Le nombre de copies de pB10 1 µg d'ADN = $0,023 \cdot 10^{-12} \times 6,022 \cdot 10^{23} = 1,385 \cdot 10^{10}$ copies.

D'où il vient que 1 µg d'ADN plasmidique de pB10 contient $1,4 \cdot 10^{10}$ copies de plasmide.

Annexe 4 : Publications scientifiques relatives aux travaux de thèse

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Jan. 2010, p. 378–382

Vol. 76, No. 1

0099-2240/10/\$12.00 doi:10.1128/AEM.01125-09

Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Monitoring the Dissemination of the Broad-Host-Range Plasmid pB10 in Sediment Microcosms by Quantitative PCR[†]

Sébastien Bonot^{1,2} and Christophe Merlin^{2*}

Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement (CIRSEE), Suez Environnement, 38 Tue du Président Wilson, 78230 Le Pecq, France,¹ and LCPME, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy-Université, CNRS, 405 Rue de Vandoeuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France²

Received 15 May 2009/Accepted 2 November 2009

Studying the transfer of specific mobile genetic elements in complex environmental matrices remains difficult because suitable molecular tools are not yet available to back up classical culture-dependent approaches. In this report, we show that quantitative PCR could be used to monitor the dissemination of the broad-host-range plasmid pB10 in sediment microcosms. This approach lies in the differential measurement of the host and plasmid DNAs used to inoculate the microcosms, using a particular design of quantitative PCR primers/probes where we took advantage of the mosaic aspect of the bacterial genomes to achieve a highly specific quantitative PCR detection system.

Despite the progress made in our understanding of the basic mechanisms involved in horizontal gene transfer (12) and our awareness of their implications in bacterial evolution (1, 5), the dynamics of the genetic phenomenon involved still need to be evaluated in environmental contexts. As a matter of fact, our current vision of gene transfer is limited to either transfer experiments carried out *in vitro*, when talking about the basic mechanisms involved, or retrospective analyses, when studying the spread of relevant genetic markers among environmental bacteria. *In situ* transfer experiments were also of great interest, but they reached some limitations since no convenient tools could avoid selection and detection difficulties (11, 15, 16). Classically, the quantification of gene transfer involves culture-based methods and selection, which present major drawbacks when dealing with environmental samples (11, 15): first, it is believed that less than 1% of the environmental bacteria are cultivable, and second, the transferred genes may present a narrow host range of expression, which restricts their proper selection. As a consequence, culture-based approaches often lead to an underestimation of the bacterial counts, therefore limiting our perception of the extent of gene transfer in complex environments (11). Lately, elegant alternatives making use of plasmids tagged with green fluorescent protein genes for the fluorescent detection of transconjugants *in situ* have been developed (4, 11). Despite a better evaluation of the transfer frequencies, these approaches are restricted to the detection of transconjugants expressing fluorescent proteins well, and they still require the genetic alteration of the element studied. Molecular techniques such as PCR and quantitative PCR (qPCR) also offer the advantage of being both culture independent and gene expression independent since they are

based solely on the specific detection of a given nucleotide sequence (10). Nevertheless, because many DNA markers are shared by various genetic entities/genomes, molecular approaches have mostly been restricted to the quantification of redundant conserved sequences in microbial communities rather than being used to specifically monitor the fate of a given mobile genetic element in complex environmental matrices. In this report, we show that the dissemination of the broad-host-range plasmid pB10 can be monitored in sediment microcosms by using a qPCR-based approach if specific primers are carefully designed.

Designing qPCR primers specific to pB10 and DH5 α DNA. Monitoring of the fate of plasmid pB10 by qPCR following the inoculation of sediment microcosms required that both plasmid and donor bacteria (here *Escherichia coli* DH5 α) could be quantified using highly specific primer/probe sets. Sequence comparisons of the plasmid with "nr" nucleotide databases using blastn software (NCBI) quickly turned off the possibility of targeting a specific pB10 marker, since extensive similarities with other genetic entities could be observed all along the pB10 sequence (not shown). Nevertheless, recent advances in genomics have taught us that bacterial genomes display a mosaic structure (6), where their originality lies in the particular combination of DNA blocks rather than in specific DNA sequences themselves. Taking advantage of this mosaic aspect, we used the "Primer Express v2.0" software program (Applied Biosystems) to elaborate a set of qPCR primers designed to prime on both sides of a unique junction between building blocks. The block organization of plasmid pB10 is illustrated in Fig. 1A. Basically, it consists of an IncP β backbone having acquired a class 1 integron and four transposable elements, which exhibit various degrees of alteration (9). The junctions between pB10's blocks could easily be identified by sequence comparison, since each side of the junction matches sequences from different mobile genetic elements. Seven of these junctions were found in the transposons' region of pB10, and one of them, junction J3, was targeted for qPCR primer/probe design because of its putative stability (Fig. 1B and Table 1). First, junction J3 connects truncated versions of the trans-

* Corresponding author. Mailing address: LCPME, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy-Université, CNRS, 405 rue de Vandoeuvre, F-54600 Villers-lès-Nancy, France. Phone: 33 (0)3 83 68 22 30. Fax: 33 (0)3 83 68 22 33. E-mail: christophe.merlin@pharma.uhp-nancy.fr.

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 6 November 2009.

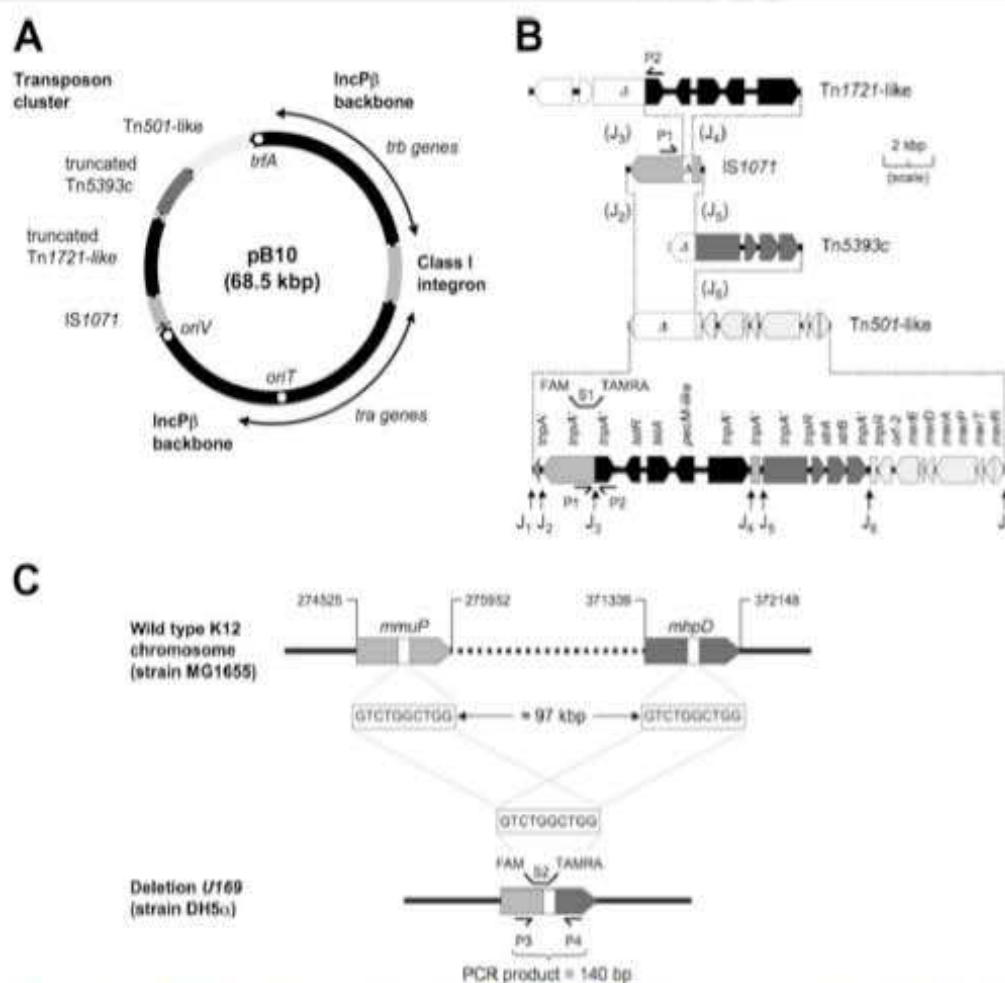


FIG. 1. Primer and probe design for the specific detection of pB10 and DH5α. (A) Schematic representation of the basic building blocks shaping plasmid pB10. Plasmid pB10 consists of a classical IncPβ backbone structure with the addition of a class I integron between the *trb* and *tra* gene clusters and the accumulation of four incomplete transposons between the *oriV* and the *oriA* genes. (B) Detailed genetic organization of the transposon cluster (bottom). The actual transposon cluster results from the successive insertion of four elements (Tn501-like, Tn5393c, IS1071, and Tn1721-like transposons) and the loss of genetic material (indicated by white boxes). Careful sequence comparison with known unaltered archetype transposons allows the identification of several original junctions (J) between each of these building blocks. Primers used for qPCR quantification of pB10 (P1 and P2) anneal on both sides of junction J3, while the S1 TaqMan probe anneals upstream of J3 (Table 1). (C) Primer design for the detection of DH5α by qPCR. The 97,239-bp *U169* deletion of DH5α results from the homologous recombination between two direct repeats of 10 bp (GTCTGGCTGG), thus joining distant sequences from the *mmuP* and *mhpD* genes. Primers and probes used for qPCR quantification of DH5α (P3/P4 and S2; Table 1) anneal on both sides of the remaining repeat.

posons Tn1721-like and IS1071, lacking either or both parts of the transposase genes and the recognized extremities, which makes them unable to transpose. Second, sequence analysis (see Methods in the supplemental material) of the pB10 transposons' region identified only poorly conserved repeats, making homologous recombination unlikely, apart from the two direct sequence repetitions covering the two *tnpA* genes of the truncated Tn1721-like transposon next to the J3 junction (99.9% identity over 902 nucleotides). A recombination happening between these two repeats should delete the region in between but would leave an intact copy of the repeat, keeping junction J3 unaltered and still quantifiable by qPCR.

The design of qPCR primers specific to the genome of *E. coli* DH5α was also based on the identification of unique junc-

tions between building blocks. Compared to the wild-type *E. coli* K12 chromosome, DH5α displays a few distinctive features, among which is the (*argF-lac*)*U169* deletion that is widely shared among K12 laboratory derivatives. The (*argF-lac*)*U169* deletion, sequenced in *E. coli* MC4100, corresponds to the loss of a 97,239-bp DNA fragment that brought together the distant sequences of the *mmuP* and *mhpD* genes (7). This distinctive feature was used to elaborate two primers designed to prime on both sides of the *U169* deletion (Fig. 1C and Table 1).

Testing specificities and sensitivities of primers in environmental samples. The specificity of each primer set and of their accompanying TaqMan probes (Table 1) was evaluated with a series of qPCR tests using template DNA extracted from 20

TABLE 1. Primers and probes used for specific detection of plasmid pB10 and *E. coli* DH5 α by qPCR

Primer or probe	Sequence	Target	Priming coordinates ^a	Amplicon size, bp (purpose)
Primers				
P1	5'-CAATACCGAAGAAAGCATGCG-3'	<i>tnpA</i> of IS1071 in pB10	45968–45988 (NC_004840)	135 (detection of pB10)
P2	5'-AGATATGGGTATAGAACAGCCGTCC-3'	<i>tnpA</i> of Tn1721 in pB10	46078–46102 (NC_004840)	
P3	5'-ACCGGGTACATCATTTC-3'	<i>mmuP</i> of K12	274654–274671 (U00096)	140 (detection of DH5 α)
P4	5'-GCCCCGGTAAGAATGAT-3'	<i>nhpD</i> of K12	372917–372933 (U00096)	
Probes				
S1	(FAM)5'-CCTCCACGGTGC GCGCTG-3' (TAMRA)	<i>tnpA</i> of IS1071 in pB10	45990–46007 (NC_004840)	(detection of pB10)
S2	(FAM)5'-TCTGATTGGTGC GCTGGTGTCT GG-3' (TAMRA)	<i>U169</i> deletion	274704–274729 (U00096)	(detection of DH5 α)

^a Accession numbers of the template DNA sequences are indicated in parentheses.

different environmental samples originating from different locations and/or collected at different times (see Table S1 in the supplemental material). Total environmental DNA was extracted using a method adapted from the work of Porteous et al. (8) (see the supplemental material for details), and qPCR assays were run with and without the addition of DNA from DH5 α or pB10. As expected, no amplification signal could be detected unless DNA from pB10 or DH5 α was added to the qPCR reactions, thus demonstrating the uniqueness of each of the block junctions targeted. The sensitivity of the qPCR design to quantify pB10 and its host from complex environmental matrices was determined by inoculating environmental samples with known quantities of DH5 α /pB10 bacteria, followed by immediate extraction of total DNA and quantification by qPCR. Considering an average of 2 pB10 copies per cell (typically 1 to 3 per cell for IncP plasmids), it appeared that only ca. 20% of the expected pB10 and 0.25% of the expected DH5 α DNA could be recovered and quantified from sediment samples, accounting for an overestimated pB10/DH5 α ratio of ca. 150. This discrepancy probably reflects different efficiencies of recovering plasmid DNA as opposed to long and fragile

chromosomal DNA. This also means that quantitative data have to be analyzed in terms of rate of disappearance/appearance for a given target DNA rather than in terms of absolute quantities.

Monitoring the fate of pB10 sediment microcosms. The pertinence of the primers/probes designed was demonstrated in an experiment aiming at monitoring the fate of pB10 and the donor bacteria in river sediment microcosms by qPCR. A set of 800 ml microcosms, consisting of a blended mixture of river water and sediments sampled in the Moselle River (Lorraine, France), were inoculated with 2.10⁸ DH5 α /pB10 bacteria (9) and were maintained at 20°C for 5 days with gentle aeration and regular nutritive amendment (see the supplemental material for details). Microcosms' sediments were sampled at intervals, and total community DNA was extracted as previously described before quantification of both pB10 and DH5 α DNA by qPCR (see the supplemental material for details). As shown in Fig. 2A, the concentration of pB10 detected remained relatively stable over the duration of the microcosm operation (5 days). Interestingly, the fate of DH5 α differs drastically from that of pB10 (Fig. 2B), with a complete loss of the DH5 α DNA

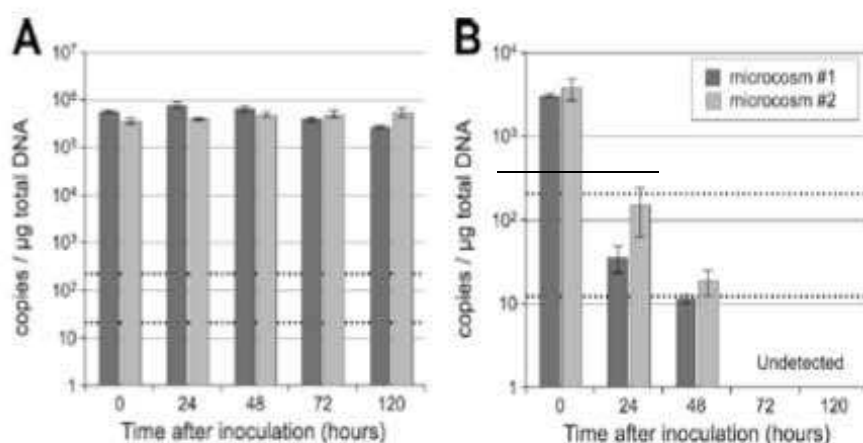


FIG. 2. Monitoring the fate of pB10 (A) and DH5 α (B) by qPCR over a 5-day period. Two microcosms were set up with an identical sediment sample and run independently. The same community DNA was used for the quantification of both pB10 and DH5 α by qPCR. Each qPCR was carried out in triplicate (error bars show standard deviations). All data were normalized to total community DNA and expressed as a number of copies per μ g of community DNA. Top dotted lines represent limits below which the linearity between the C_T values and log DNA copy number is lost (see Methods in the supplemental material for details). Bottom dotted lines correspond to a detection limit of 1 DNA copy per reaction. In some instances, values slightly below 1 DNA copy per reaction resulted from the mathematical conversion of C_T values too close to the detection limit.

detected within 48 h, indicating that the apparent stability of pB10 is likely to be due to an early invasion of the bacterial community. Control microcosms with uninoculated sediments were systematically run, sampled, and treated in parallel. For these microcosms, undetected by qPCR DH5 α and pB10 remained throughout the experiment, thus showing that the pB10 detected in the inoculated microcosms did not correspond to the unexpected resurgence of a closely related sequence originating from the sediment population. Additionally, a second set of controlled microcosms inoculated with naked pB10 DNA showed that the amount of plasmid decreased steadily from time zero and became undetectable after 48 h (not shown). This rapid loss (2 logs in 48 h) excludes the possibility that pB10 could have persisted extracellularly in the experiment depicted in Fig. 2.

Discussion. To the best of our knowledge, this is the first time that the dissemination of a broad-host-range plasmid has been monitored at the molecular level in a complex environment. This was made possible by focusing the design of qPCR primers around unique genome structures—building block junctions—rather than looking for specific DNA markers that are rather rare in complex communities, especially when promiscuous IncP plasmids such as pB10 are involved. Because this design is specific enough to detect and quantify a given DNA segment in a complex DNA mixture, it now opens up a wide range of possibilities in matters of environmental genetics for studying the dynamics of gene transfer in complex environmental matrices without disturbing the indigenous communities with excessive donor inoculums, as can be the case with classical methods (see reference 14 and references therein).

Despite avoiding biases associated with the culture of microorganisms, the qPCR approach described here has some limitations when it comes to quantification. Indeed, the data generated in this study were treated as if DNA could be recovered with the same 100% efficiency whatever its nature (plasmid or genomic), its origin (from pure culture or microcosms), or the purification protocol used, which is not really the case. Actually, while generating highly accurate standard curves (threshold cycle [C_T] versus concentration of pure DNA), we could obtain an extinction of the signal for expected concentrations of template DNA close to 1 copy per qPCR assay (ca. 1 and 5 copies per qPCR assay for pB10 and DH5 α , respectively), thus attesting that the concentrations of the targeted sequences were properly estimated. In fact, difficulties arose when extracting DNA from environmental samples, because pB10 and DH5 α genomic DNA could not be recovered with the same level of efficiency, which implies that the two DNA templates are not directly comparable from a quantitative point of view. Nonetheless, with the concentration of the recovered DNA remaining proportional to the initial concentration in a given environmental sample, it is possible to monitor accurately the fate of a particular DNA sequence over time, as far as it involves identical extraction and quantification conditions. From this, rates of appearance/disappearance can be obtained independently for different DNA targets, and compared between each other, as has been done here for pB10 and DH5 α DNA, since they do not relate absolute quantities of DNA but the evolution of these quantities.

In order to better highlight the transfer of pB10, as opposed to its stable maintenance in the donor strain, we deliberately

chose a donor bacterium with poor chances of survival in sediment microcosms, first because this is not the natural habitat of *E. coli* and second because the numerous genetic alterations of the laboratory-adapted strain DH5 α are likely to reduce even further its fitness in such an environment. In this respect, the data presented here evidenced that following the microcosm inoculation, the amount of DH5 α DNA quickly decreased, becoming undetectable after 3 days. This is in good accordance with previous observations made by Top et al. (13) showing that *E. coli* survival in soil was deeply influenced by the availability of favorable substrates and the presence of indigenous competitors. In their work, Top et al. (13) also showed that the appearance of transconjugants correlated with the survival of the *E. coli* donor bacteria. Nevertheless, it should be remembered that in these experiments, the plate-counting approach used narrowed the study to the gene transmission toward one recipient strain only, while any indigenous recipient could be considered with the molecular approach we developed.

Interestingly enough, we observed that pB10 was maintained at a steady-state level while the *E. coli* donor was quickly disappearing, which tends to show that most of the transconjugants formed at an early stage in the microcosm experiment. This is reminiscent of previous observations made by Fulthorpe and Wyndham (3), for instance, where a sediment microcosm inoculated with the 3-chlorobenzoate (3Cba)-degrading strain *Alcaligenes* sp. BR60 kept a constant level of 3Cba degraders under selective pressure while BR60 disappeared. Further analyses also showed that the mobile genetic element hosting the catabolic genes of the donor strain BR60, a Tn5271 catabolic transposon inserted into the broad-host-range plasmid pBRC60, was detected at a constant level throughout the experiment even after the loss of the donor. The hypothesis we are currently favoring to explain the apparent stability of the pB10 copy number in our microcosm experiment relates to the spatial structure of the habitat. Recently it has been shown that pB10 can invade a wider part of the recipient population if the spatial structure of the habitat is regularly disturbed (2). Indeed, in a complex environmental matrix, such as sediments, the populations are likely to organize in clusters physically isolated from one another and the transfer of pB10 would be limited to adjacent cells. Further transfer experiments with microcosms exposed to various shearing protocols should highlight the relative importance of the spatial structure compared to other environmental parameters (e.g., temperature, nutrients, origin of environmental samples, etc.).

We thank S. Courtois, Z. Do Quang, and J. M. Audic for discussion and advice.

This work was initiated thanks to a collaboration with SUEZ-Environment and their financial support. Additional support was gained from the EC2CO national program. S. Bonot was a recipient of a CIFRE fellowship from the ANRT and SUEZ-Environment.

REFERENCES

1. de la Cruz, F., and J. Davies. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 8:128–133.
2. Fox, R. E., X. Zhong, S. M. Krone, and E. M. Top. 2008. Spatial structure and nutrients promote invasion of IncP-1 plasmids in bacterial populations. *ISME J.* 2:1024–1039.
3. Fulthorpe, R. R., and R. C. Wyndham. 1992. Involvement of a chlorobenzoate-catabolic transposon, Tn5271, in community adaptation to chlorobi-

- phenyl, chloroaniline, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:314–325.
4. Geisenberger, O., A. Ammendola, B. B. Christensen, S. Molin, K.-H. Schleifer, and L. Eberl. 1999. Monitoring the conjugal transfer of plasmid RP4 in activated sludge and in situ identification of the transconjugants. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**:9–17.
 5. Gogarten, J. P., and J. P. Townsend. 2005. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:679–687.
 6. Ochman, H., J. G. Lawrence, and E. A. Groisman. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299–304.
 7. Peters, J. E., T. E. Thate, and N. L. Craig. 2003. Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *J. Bacteriol.* **185**:2017–2021.
 8. Porteous, L. A., R. J. Sheldrick, and L. S. Watrud. 1997. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol. Ecol.* **6**:787–791.
 9. Schlöter, A., H. Heuer, R. Szczepanowski, L. J. Forney, M. Thomas, A. Pühler, and E. M. Top. 2003. The 64 508 bp IncP-1 β antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 β group. *Microbiology* **149**:3139–3153.
 10. Smith, C. J., and A. M. Osborn. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **67**:6–20.
 11. Sørensen, S. J., M. Bailey, L. H. Hansen, N. Kroer, and S. Wuertz. 2005. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:700–710.
 12. Thomas, C. M., and K. M. Nielsen. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:711–721.
 13. Top, E., M. Mergeay, D. Springael, and W. Verstraete. 1990. Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alicycobacter eutrophus* on agar plates and in soil samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2471–2479.
 14. van Elsas, J. D., H. Boersma, and E. Smit. 2004. Detection of bacterial conjugation in soil, p. 1141–1150. In G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. Akkermans, and J. D. van Elsas (ed.), *molecular microbial ecology manual*, 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
 15. van Elsas, J. D., and M. J. Bailey. 2002. The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**:187–197.
 16. van Elsas, J. D., P. Fry, P. Hirsch, and S. Molin. 2000. Ecology of plasmid transfer and spread, p. 175–206. In C. M. Thomas (ed.), *The horizontal gene pool: bacterial plasmids and gene spread*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, the Netherlands.

Improving the recovery of qPCR-grade DNA from sludge and sediment

Sébastien Bonot^{1,2}, Sophie Courtois², Jean-Claude Block¹ and Christophe Merlin^{*1}

Addresses:

¹ LCPME, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy-Université, CNRS, 405 rue de Vandoeuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France

² Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement (CIRSEE – Suez Environnement), 38 rue du président Wilson, 78230 Le Pecq, France

* Corresponding author:

Christophe MERLIN

Tel.: +33 (0)3 83 68 22 30

Fax.: +33(0)3 83 68 22 33

E-mail: Christophe.Merlin@pharma.uhp-nancy.fr

Abstract

DNA extraction is often considered as the limiting step of most molecular approaches in ecology and environmental microbiology. Ten existing DNA extraction protocols were compared for recovery of DNA from sludge and a modified version of the protocol described by Porteous *et al.* 1997 (Mol.Ecol. 6:787-791) was determined to be the best method for recovery of DNA suitable for PCR. In this respect, it appeared that the commonly used guanidine isothiocyanate can impair the quality of the extracted DNA unless its concentration is lowered. Second, conditioning the samples as liquors as opposed to pellets critically impacts the outcome of the extraction. The suitability of the modified Porteous protocol for quantitative PCR applications is demonstrated in a series of experiments showing the absence of interfering co-extracted inhibitors, and the linear correspondence between the concentrations of input target DNA and PCR product. Interestingly, it is also shown that the nature of the environmental matrices affects the recovery yield of both circular plasmids and chromosomal DNA, resulting in an apparent fluctuation of the plasmid copy number per cell. This means that quantitative data obtained by PCR remain comparable as long as they apply to an identical target sequence extracted from a similar environment and amplified under the same conditions.

Keywords

DNA extraction - qPCR - Sludge - Sediment - pB10 plasmid

Introduction

By providing an alternative to the under-estimating culture-based approaches, the introduction of molecular techniques in ecological studies has revolutionized our perception of microbial community structures and their dynamics. In this respect, PCR played a pivotal role in these developments by providing a mean to unravel the unseen minority in the vastness of microbial communities (Smith and Osborn 2009). Nevertheless, as for any enzymatic reaction, the success of PCR is strongly influenced by the conditions provided, the quality of the extracted DNA, and the absence of inhibitor molecules known to interfere with the reaction (Wilson 1997, Rådström et al. 2004). Inhibitors have been a recurrent problem when working with DNA from environmental samples (so called “environmental DNA”). They can have various origins, some being environmental molecules co-extracted with DNA (e.g., humic acid, metals, and proteins), and others simply carry-overs of compounds used during the extraction process (e.g., phenol and ethanol). As a matter of fact, the extraction of DNA is a very critical issue as it determines the outcome of most PCR-based approaches in environmental studies (Wilson 1997, Rådström et al. 2004). This is particularly true when working with highly sensitive techniques such as quantitative PCR (qPCR) for which, in addition to the usual inhibition of the enzymatic reaction, environmental contaminants can also interfere with the detection method based on fluorescence (Stults et al. 2001).

At present, there is no standard protocol allowing the extraction of high purity/integrity DNA from different environmental matrices. Although most DNA extraction protocols have been established on a common framework (cell lysis, DNA extraction, DNA purification), many variations have been introduced over time to overcome specific difficulties encountered with given environmental samples. This raises the problem of being able to extract DNA with the same level of purity and integrity when comparing microbial communities from different environments using the same molecular approach.

Recently, we have initiated environmental studies aimed at monitoring horizontal gene transfer at the molecular level in different environmental matrices (Bonot and Merlin, 2010). Because we did not want the DNA extraction protocol used to interfere with the output of qPCR-based experiments, we first focused on finding a unique protocol enabling the extraction of clean DNA from different kinds of environmental matrices (e.g., river sediments or sludge from wastewater treatment plants). In this report, 10 known DNA extraction protocols, along with variants of them, are compared in terms of DNA yield, integrity, and purity. One of them was retained and further improved in order to extract qPCR-grade community DNA from environments as different as activated and anaerobic sludge from wastewater treatment plants, and river sediments. Interestingly, while evaluating the suitability of the extracted DNA for qPCR, it appeared that the apparent plasmid copy number per host cell of a model bacterium was fluctuating depending on the environmental matrix from which DNA was extracted, clearly establishing some limits regarding the range of possible applications for qPCR.

Materials and methods

Environmental samples

The origins and characteristics of the different environmental samples used in this study are summarized in Table 1. The various DNA extraction protocols listed in Table 2 were first

tested on an activated sludge sample collected in the wastewater treatment plant WWTP 1. Samples were fractionated in 50 mL aliquots and concentrated by centrifugation at 5000 rpm for 30 min in a M4-11175338 horizontal rotor (Jouan G412). Samples were then frozen at -80°C prior to the DNA extraction either as pellets or after having been dispersed in an equal volume of wastewater supernatant (“liquor”). Later on, a modified version of the Porteous et al. (1997) protocol (see below) was further tested on samples of different origins prepared as liquors: two activated sludge samples originating from two wastewater treatment plants (WWTP 2 and WWTP 3), one sludge sample from an anaerobic digester (WWTP 4), one sludge biofilm from a moving bed biofilm reactor (WWTP 4), one compressed sludge sample from a sludge dewatering press (WWTP 5), and finally one river sediment sample from the Moselle river at Golbey (Lorraine, France). A sediment analysis obtained from the Laboratory of Environment and Mineralurgy (LEM, Nancy-University, France) showed the following chemical composition: 78% wt SiO₂, 9% wt Al₂O₃, 3% wt Fe₂O₃, 3.5% wt K₂O, 1% wt MgO, and finally 2% wt loss on ignition which can be attributed to natural organic matter; with the following particle size distribution: 30% wt greater than 2 mm, 64.5% wt in the 250 µm – 2 mm fraction, 5% wt in the 50 µm – 250 µm fraction, 0.5% wt less than 50 µm.

Extraction of environmental DNA

All the protocols tested and their accompanying references are listed in Table 2. The protocol adapted from Porteous et al. (1997) is as follows: 500 mg of thawed liquor sample are mixed with 925 µL of SDS lysis buffer (0.25 M sodium chloride (NaCl), 0.1 M sodium ethylenediaminetetraacetic acid (Na₂EDTA), 4% sodium dodecyl sulphate (SDS)) and 75 µL of 4 M guanidine isothiocyanate. Samples are then vortexed for 1 min, sonicated at 180 W for 2 min in an ultrasound water bath (Transsonic Digitals), and incubated for 90 min at 68°C. The mixture is finally centrifuged at 13000 g for 15 min at 4°C and 600 µL of supernatant are collected. The crude extract is concentrated by precipitation after addition of 75 µL of 5 M potassium acetate and 250 µL of 50% polyethylene glycol 8000 are added to the supernatant. The solution is mixed slowly and the crude extract is precipitated for 1 h at -20°C before recovery by centrifugation at 13000 g for 15 min at 4°C. The pellet is then dissolved in 900 µL of 2×CTAB (2% hexadecyltrimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA), sonicated for 1 min at 180 W, and incubated for 15 min at 68°C. The sample is then gently mixed with 900 µL of chloroform and the aqueous phase is recovered after centrifugation at 13000 g for 10 min at room temperature. The DNA is allowed to precipitate for 25 min at -20°C after adding 1 mL of isopropanol. DNA is then pelleted by centrifugation at 13000 g for 15 min at 4°C, subsequently dissolved in 450 µL of 2.5 M ammonium acetate and mixed with 1 mL of 95% ethanol for another 25 min precipitation at -20°C. The DNA is pelleted again by centrifugation at 13000 g for 15 min at 4°C and resuspended in 450 µL of 1×TAE buffer (0.04 M Tris acetate (pH 8.0), 0.001 M Na₂EDTA). Residual impurities are eliminated by filtration on a Microcon-100 microconcentrator (Amicon, Beverly, Massachusetts, USA) where DNA is washed twice with 450 µL of 1×TAE buffer and once with 450 µL of 1×TE buffer (0.01 M Tris HCl (pH 8.0), 0.001 M Na₂EDTA). DNA is then eluted by centrifugation at 500 g for 5 min at room temperature after adding 100 µL of 1×TE buffer on the inverted microconcentrator.

Evaluation of DNA concentration and purity

Concentration and purity of the DNA were first assessed by UV spectrometry at 230, 260, and 280 nm (spectrophotometer Eppendorf BioPhotometer 6131). The concentration of DNA was calculated from the A_{260} measurements. The purity of the DNA was estimated with the A_{260}/A_{230} and A_{260}/A_{280} ratios where values below 1.8-2.0 typically reflected contamination by substances (e.g., humic substances and aromatic molecules) and by proteins, respectively. Second, the fragmentation of the DNA was evaluated by electrophoresis in 1% agarose-TAE gel. Only the DNA presenting high molecular weight molecules were considered as having a good level of integrity. Finally, the absence of inhibitors was evaluated by testing the suitability of the purified DNA to be used as template for PCR. The 16S ribosomal gene was PCR amplified from 100 ng of extracted DNA, using the universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') as described by Lane (1991). PCR reactions were carried out in a 50 μ L reaction mixture containing 200 μ M of each dNTP, 0.4 μ M of each primer, 2.5 units of Taq DNA polymerase (New England Biolabs), 1.5 mM $MgCl_2$, and 1 $\times$ reaction buffer. PCR cycling conditions consisted of an initial denaturation step of 1 min at 94°C, followed by 30 cycles for amplification (94°C for 1 min., 60°C for 1 min., 72°C for 1.5 min.), and a final elongation step of 7 min at 72°C. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose-TAE gels.

Quantitative PCR

The *Escherichia coli* strain DH5 α /pB10 (Schlüter et al. 2003) was used as a control to evaluate the suitability of the extracted DNA for qPCR applications. Quantifications of both pB10 plasmid and DH5 α chromosomal DNA by qPCR were carried out using primers (from Eurogentec) and FAM/TAMRA probe (from Applied Biosystems) previously described by Bonot and Merlin (2010). Briefly, pB10 quantification was achieved with primers 5'-CAATACCGAAGAAAGCATGCG-3' and 5'-AGATATGGGTATAGAACAGCCGTC-3' combined with the Taqman probe (FAM)5'-CCTCCACGGTGCGCGCTG-3'(TAMRA), while DH5 α chromosomal DNA quantification was achieved with primers 5'-ACCGGGTACATCATTTC-3' and 5'-GCCCCGGTAAGAATGAT-3' combined with the Taqman probe (FAM)5'-TCTGATTGGTGCGCTGGTGGTCTGG-3'(TAMRA). Quantitative PCR was carried out using the "TaqMan® Universal PCR Master Mix, NoAmpErase® UNG" kit from Applied Biosystems in the conditions recommended by the manufacturer, with 800 nM of each primer and 300 nM of TaqMan probe in a 50 μ L final reaction volume. qPCR amplifications were run in an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) with thermal cycling conditions as follows: 2 min at 50°C, then 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Standard curves correlating the detection threshold of the fluorescence signal (C_T) with known concentrations of target DNA (pB10 or DH5 α chromosome) were generated from qPCR experiments on pure DNA. Pure DNA templates were obtained as follows: pB10 was extracted from DH5 α /pB10 using a Wizard®Plus SV Minipreps kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA), DNA was then linearized by digestion with BamH1 (Promega), followed by purification using a QIAquick® PCR purification kit (QIAGEN). Genomic DNA from DH5 α was extracted using the AquaPure Genomic DNA isolation kit (Bio-Rad). For the quantification of pB10 and DH5 α in environmental samples, optimal qPCR amplifications were obtained using 50 ng and 75 ng of template community DNA per reaction, respectively.

Results

Comparing protocols for DNA extraction from activated sludge

A set of 10 protocols for DNA extraction from environmental samples were selected from the literature for having already been used to produce PCR-grade nucleic acids from samples such as sludge and soil, and/or for having been shown to produce high purity DNA in other comparative studies (see Table 2 for references). Among the numerous protocols available from the literature, our choice was driven by their apparent efficiency in removing humics or aluminum salts (often used as flocculant agent in WWTP processes), by their ability to produce good yields of PCR-grade DNA, and finally by the technical alternative proposed. Each protocol was tested for DNA extraction from a same activated sludge sample collected at WWTP 1 (Table 1), and compared regarding DNA yield, DNA purity, DNA integrity, and their suitability to be used as template in PCR. Because some authors (see Lemarchand et al. (2005) for instance) favored DNA extraction from liquors rather than from pellet samples, both sample treatments were tested. As shown in Table 2, environmental DNA was obtained with various degrees of concentration, purity, and fragmentation depending on the protocol considered (Table 2, Figure 1). Out of the ten protocols tested (6 times each), only two allowed extraction of amplifiable DNA: a protocol adapted from Porteous et al. (1997) and, to a lesser extent, the QIAamp DNA stool[®] kit from QIAGEN. Indeed, 6 DNA extractions were carried out again on a new sludge sample originating from the same WWTP and, this time, PCR positive extracts were obtained solely with the protocol adapted from Porteous and coworkers, which thus appeared more robust. Importantly, it should be noted that when using the protocol developed by Porteous et al. (1997), PCR amplification could be obtained only when the purity of DNA was improved by reducing the concentration of guanidine isothiocyanate from 5 M to 4 M in the first step of the extraction (see Materials and methods section for details). Not surprisingly, for most of the protocols tested, the absence of PCR amplification is correlated with A_{260}/A_{230} and/or A_{260}/A_{280} ratios below 1.8-2.0, attesting to the presence of chemical contaminants (Table 2). Interestingly, for unknown reasons, sludge had to be conditioned as liquors in order to recover PCR-amplifiable DNA.

Testing total DNA extraction protocols on various environmental samples

In order to consider any peculiar effect associated to the first sample used, the method adapted from Porteous et al. (1997) and the QIAamp DNA stool[®] kit were further evaluated by extracting DNA from different environmental samples (Table 1): two additional activated sludge samples from different origins, an anaerobic sludge, a compressed sludge sample obtained from a dewatering press, and finally a river sediment (3 extractions for each sample). For this second screening, only the DNA extracted with the method adapted from Porteous and coworkers produced DNA of good purity (A_{260}/A_{230} and A_{260}/A_{280} ratios between 1.8 and 2.0) with 3 out of 3 extracts positive in PCR tests for each sample (Table 3). Although DNA extractions carried out with the QIAamp DNA stool[®] kit gave results similar to those presented in Table 2 regarding spectrometric analyses, only a few of the DNA extracts were amplifiable by PCR, regardless of the sample origin (not shown).

Evaluating the suitability of the extracted DNA for quantitative PCR

The quality of the DNA extracted using the Porteous-based protocol was further investigated to evaluate its suitability for qPCR applications. In a first set of tests, the absence of inhibiting substances was demonstrated by evaluating the effect of the addition of the extracted DNA on the quantification of pB10 plasmid by qPCR. To do so, known quantities of pB10 plasmid were quantified by qPCR before and after the addition of 50 ng of environmental DNA. As shown in Fig. 2, the Threshold Cycle (C_T) values remained unchanged for a wide range of pB10 concentrations (Fig. 2a) or whatever the origin of the environmental DNA added (Fig. 2b), thus attesting to the absence of interfering substances. To be suitable for qPCR, a DNA extraction protocol should also guarantee the linear relationship between the amount of target DNA initially present in the sample and the amount of target detected. To check this, aliquots of activated sludge sampled from WWTP1 were inoculated with known quantities of *Escherichia coli* DH5 α /pB10 cells (ranging from 3.7×10^2 to 2.6×10^6 CFU per mL of sludge), total DNA was immediately extracted by the Porteous-based protocol, and the amount of both DH5 α chromosomal DNA and pB10 plasmid DNA was quantified by qPCR. The linear relationship between the amount of DNA expected and the amount of DNA measured clearly shows that the extraction method used is well suited for qPCR experiments, despite a limited yield of DNA recovery and quantification, where 1-1.5% of the inoculated DH5 α cells could be detected by qPCR after extraction (Fig. 3a). A similar experiment carried out on different environmental matrices showed that this yield of recovery/detection could vary from 0.1 to 1.5% depending on the environmental sample considered (Fig. 3b). Interestingly, Fig. 3b also shows that the ratios between the plasmid copy number and those of DH5 α chromosome varied according to the type of environmental matrices used for extraction, where up to 200 times more pB10 plasmid than DH5 α chromosome could be detected from sediment extracts, while this ratio falls to 10-30 in the case of activated sludge extracts. As discussed below, this discrepancy is likely to be due to different efficiencies in recovering plasmid and chromosomal DNA, where only 5-15 plasmid copies per cell are expected (Adamczyk and Agura-Burdzy 2003, Adamczyk et al. 2006).

Discussion

The quality of the DNA extracted from environmental samples has been a recurrent limiting factor when using molecular approaches, mostly because of the inhibiting molecules that co-extract with nucleic acids. In this respect, the numerous DNA extraction protocols that are now available reflect different alternatives to deal with various environments, each one with specific inhibitors. As a consequence, “universal” protocols are nonexistent, thus limiting comparative analyses to closely related environmental samples. With this study our objective was to improve environmental nucleic acid extraction in order to get qPCR-grade DNA from environments as different as activated sludge and river sediments. Here 10 existing methods were tested and compared with variations, and in our hands only 2 produced PCR amplifiable DNA, namely a protocol adapted from Porteous et al. (1997) and the QIAamp DNA Stool® Mini Kit from QIAGEN. At first sight, it is quite surprising to note that some protocols that have previously been shown to work on similar samples failed to give PCR amplifiable DNA. Actually, this is likely to be due to few unspecified critical points in the protocols (such as sample handling, ultrasound power, etc) that make all the difference, thereby reflecting the extreme sensitivity of these DNA extraction methods. Nevertheless, we could not exclude any peculiar effect linked to the the sample we used, which might also have influenced the quality of the DNA extracted. Interestingly enough, the conditioning of the samples into liquors

seemed to be a critical point to obtaining amplifiable DNA as compared to pellet samples as starting material. We hypothesized that the desorption of inhibiting substances might be favored by the reorganization of the sample aggregate structures caused by lowering the water content, but this remains to be demonstrated. A second improvement lies in the reduction of guanidine isothiocyanate concentration used in the initial step of the Porteous et al. (1997) method, from 5 M to 4 M. Apparently, it did not solely improve the spectrophotometric characteristics of the extracted DNA (by limiting the carry-over of the compounds), but it also contributed to the recovery of amplifiable DNA. To the best of our knowledge, guanidine isothiocyanate has never been reported as a PCR inhibitor. We strongly suggest checking the influence of both parameters, guanidine isothiocyanate and sample conditioning, in case of failure when extracting environmental DNA whatever the extraction protocol. Finally, other modifications of the Porteous et al. protocol may be of importance, such as an initial freezing step at -80°C, or changes in incubation times, but their significance has not been further tested.

The Porteous-based method presented here appeared suitable for qPCR in the sense that (1) the extracted DNA seems to be free from any inhibiting substances, and (2) a linear relationship is preserved between the amount of target DNA detected and the amount of target DNA initially present in the sample, whatever its nature, chromosomal or **plasmid**. Nevertheless, it also appeared that the relative yield of chromosome and plasmid DNA recovery could fluctuate depending on the type of environmental matrix considered. This was quite surprising since pB10 plasmid belongs to the family of IncP plasmids, which are believed to exhibit a relatively stable copy number of 5-15 per cell (Adamczyk and Agura-Burdzy 2003, Adamczyk et al. 2006). Considering the fact that all the experiments were carried out under the same conditions, with the same inoculated strain, and without delay between inoculation of DH5 α /pB10 and DNA extraction, a difference in the yields of DNA recovery for chromosome and plasmid was the only plausible explanation which could account for the apparent fluctuation in the relative plasmid copy number per cell. At present, we favor the hypothesis that longer DNA could develop stronger interactions with environmental matrices such as sediments, and therefore remain more difficult to desorb during the extraction process. This also means that quantitative data obtained by qPCR remain comparable as long as they apply to an identical target sequence, extracted from similar environments, and amplified under the same conditions. Within these guidelines, qPCR remains a tool of choice to monitor the fate of a given DNA target in complex environmental matrices over time, as it only relates to rates of disappearance/appearance of the targeted DNA in a same environmental matrix (Bonot and Merlin, 2010).

Acknowledgments

This work was initiated thanks to the collaboration and financial support of SUEZ-Environment (funded by R+i Alliance). Additional support was gained from the EC2CO national program and Zone Atelier Moselle (ZAM). S. Bonot was recipient of a CIFRE fellowship from the ANRT and SUEZ-Environment. Part of this work was presented by S. Bonot at the 2008 WEFTEC® annual conference. We thank B. Lartiges from LEM for kindly providing a Moselle sediment analysis.

References

- Adamczyk M, Jagura-Burdzy G (2003) Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochim Pol* 50:425-453
- Adamczyk M, Dolowy P, Jonczyk M, Thomas CM, Jagura-Burdzy G (2006) The *kfrA* gene is the first in a tricistronic operon required for survival of IncP-1 plasmid R751. *Microbiology* 152:1621-1637
- Bonot S, Merlin C (2010) Monitoring the dissemination of the broad host range plasmid pB10 in sediment microcosms by quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 76: 378-382
- Bourrain M, Achouak W, Urbain V, Heulin T (1999) DNA extraction from activated sludges. *Curr Microbiol* 38:315-319
- Dong D, Yan A, Liu H, Zhang X, Xu Y (2006) Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate. *J Microbiol Methods* 66:217-222
- Guillaume G, Verbrugge D, Chasseur-Libotte ML, Moens W, Collard JM (2000) PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Microbiol Ecol* 32:77-85
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E and Goodfellow M. (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp:115–175
- Lemarchand K, Berthiaume F, Maynard C, Harel J, Payment P, Bayardelle P, Masson L, Brousseau R (2005) Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *J Microbiol Methods* 63:115-126
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol* 67:2354-2359
- Porteous LA, Seidler RJ, Watrud LS (1997) An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Molec Ecol* 6:787-791
- Purohit HJ, Kapley A, Moharikar AA, Narde G (2003) A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. *J Microbiol Methods* 52:315-323
- Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C (2004) Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 26:133-146
- Schlüter, A., H. Heuer, R. Szczepanowski, L.J. Forney, M. Thomas, A. Pühler, and E.M. Top. (2003) The 64 508 bp IncP-1 β antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 β group. *Microbiology* 149:3139-3153
- Smith CJ, Osborn AM (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 67:6-20
- Stults JR, Snoeyenbos-West O, Methe B, Lovley DR, Chandler DP (2001) Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. *Appl Environ Microbiol* 67:2781-2789
- Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63:3741-3751

Yu Z, Mohn WW (1999) Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. *Can J Microbiol* 45:269-272

Figure captions

Fig. 1 Representative electrophoretic profiles of sludge DNA extracted with 6 different protocols (numbered as in Table 2). DNA extractions were carried out on samples conditioned as pellet (P) or liquor (L). (-): low molecular weight DNA; (+): high molecular weight DNA; (+/-): intermediate-sized DNA.

Fig. 2 qPCR inhibition tests. **a** qPCR Amplification of a pB10 target sequence at different concentrations with (assays 1, 2 and 3) and without (dotted line) the addition of DNA extracted from sludge of WWTP1 (50 ng per reaction). C_T values were obtained from 3 independent sets of qPCR assays covering pB10 concentrations ranging from 1 to 10^8 copies per reaction. Each reaction was carried out in triplicates (error bars = standard deviation). The dotted line represents the corresponding control experiment (without environmental DNA) where 45 data points were compiled in a regression curve (R^2 = coefficient of determination). **b** Comparison of qPCR amplification efficiencies before and after addition of 10^4 copies of the pB10 per reaction, and in presence of environmental DNA (50 ng per reaction) from various origins (abbreviated as in Table 1). The numbers represent average C_T values obtained from 3 qPCR (error bars = standard deviation). A C_T of 45 represents the upper limit for which no target could be detected.

Fig. 3 Efficiency of DNA recovery from environmental samples. **a** Quantification of pB10 plasmid and DH5 α chromosomal DNA by qPCR after inoculation of activated sludge from WWTP1 by known quantities of DH5 α /pB10 cells, followed by immediate extraction of environmental DNA using the Porteous-based method. Each qPCR was carried out in triplicate (vertical error bars = standard deviation). The number of pB10 per cell is expected to range from 5 to 15 bringing some uncertainties in the estimated copy number per reaction (horizontal error bars). **b** Comparison of pB10 and DH5 α quantification chromosomal DNA by qPCR after inoculation of various environmental samples (abbreviated as in Table 1) with 2.5×10^6 DH5 α /pB10 cells per mL of sample, and recovery with the Porteous-based method. Each qPCR was carried out in triplicate (vertical error bars = standard deviation) and results were normalized to an equivalent of 1 μ g of environmental DNA. Numbers indicate the ratios between pB10 and DH5 α copy numbers for a given DNA extract.

Table 1. Origin and characteristics of the environmental samples used in this study

Samples origins							
Samples (designation)	Activated sludge (AS1)	Activated sludge (AS2)	Activated sludge (AS3)	Anaerobic sludge (AD)	Activated sludge biofilm (K)	Compressed sludge (CP)	Sediments (Sed.1, Sed.2, Sed.3)
Locations ^a	WWTP 1	WWTP 2	WWTP 3	WWTP 4	WWTP 4	WWTP 5	Moselle river (Golbey, France)
Sampling sites	Output of the biological basin (lift station)	Biological basin	Biological basin	Anaerobic digester	Moving bed biofilm reactor	Sludge dewatering press	River sediments (3 locations)
Sample characteristics ^b							
Flocculant agent used in WWTP	Aluminum salts	FeCl ₃	FeCl ₃	Aluminum salts.	n.a.	FeCl ₃ + Lime	n.a.
pH	6.98 - 7.39	7.06-7.89	7.00 - 7.50	n.a.	6.5	n.a.	7.00 - 8.40
Temperature (°C)	12.1 - 21	18 -21	18-19	n.a.	18	n.a.	6.0 - 7.8
Dissolved O ₂ (mg.mL ⁻¹)	1.34 - 2.9	2.1-2.2	2.0-3.0	n.a.	2.54	n.a.	4.0 - 5.1
SSV30 (mL.L ⁻¹)	200 - 298	200(d ¹ / ₂)-230(d ¹ / ₂)	190(d ¹ / ₂)-200(d ¹ / ₂)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
TSS (g.L ⁻¹)	3.40 - 6.44	4.10 - 4.88	3.71 - 4.68	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
VSS (g.L ⁻¹)	1.69 - 3.30	3.39 - 3.57	2.66 - 2.72	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
SVI (mL.g ⁻¹)	50 - 155	88 - 112	81 - 105	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

^a WWTP: Wastewater Treatment Plant. Numbers indicate different treatment plants

^b The couples of values represent minima and maxima for a set of measurements on 3 different samples

Abbreviations: SSV30: Settle Sludge Volume after 30 min; (d¹/₂): SSV30 calculated on a 2-fold dilution of sludge ; TSS: Total Suspended Solids ; VSS: Volatile Suspended Solids ; SVI: Sludge Volume Index ; n.a.: not applicable.

Table 2. Yield and purity of sludge DNA extracted using 10 different protocols ^a.

DNA extraction methods and references	Sample conditioning	DNA yield (μg DNA / g dry matter)	DNA purity		DNA integrity ^b	PCR amplification
			A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}		
(1) Sonication and phenol/chloroform extraction, according to procedure 3 of Lemarchand et al. (2005), adapted from Bourrin et al. (1999)	pellet	288 $\pm$ 88	0.78 $\pm$ 0.05	1.68 $\pm$ 0.04	+	0/6
	liquor	23 $\pm$ 6	1.87 $\pm$ 0.13	1.60 $\pm$ 0.11	+	0/6
(2) Guanidium thiocyanate, EDTA, N-lauryl-Sarcosine-based lysis, according to procedure 5 of Lemarchand et al. (2005)	pellet	not detected	-	-	-	0/6
	liquor	not detected	-	-	-	0/6
(3) Sample dispersion by sonication and DNA extraction, according to the TL procedure of Bourrain et al. (1999)	pellet	37 $\pm$ 9	1.03 $\pm$ 0.18	1.23 $\pm$ 0.31	+	0/6
	liquor	34 $\pm$ 3	1.05 $\pm$ 0.07	1.38 $\pm$ 0.05	+	0/6
(4) Bead beating and NH4 acetate precipitation, according to procedure 8 of Lemarchand et al. (2005), adapted from Yu et al. (1999)	pellet	57 $\pm$ 6	0.93 $\pm$ 0.28	1.25 $\pm$ 0.06	-	0/6
	liquor	29 $\pm$ 8	0.67 $\pm$ 0.09	1.25 $\pm$ 0.10	-	0/6
(5) Bead beating and phenol/chloroform extraction, according to procedure 9 of Lemarchand et al. (2005), adapted from Guillaume et al. (2000)	pellet	1308 $\pm$ 300	2.80 $\pm$ 0.57	1.88 $\pm$ 0.04	+/-	0/6
	liquor	2688 $\pm$ 68	1.89 $\pm$ 0.10	1.65 $\pm$ 0.08	+/-	0/6
(6) Bead beating and DNA purification on Sepharose 4B spin column, according to Martin-Laurent et al. (2001).	pellet	483 $\pm$ 38	1.02 $\pm$ 0.11	1.49 $\pm$ 0.11	+	0/6
	liquor	1494 $\pm$ 77	0.88 $\pm$ 0.03	1.44 $\pm$ 0.11	+	0/6
(7) DNA extraction and precipitation of humic substances with aluminum sulfate, according to Dong et al. (2006)	pellet	6670 $\pm$ 521	0.78 $\pm$ 0.03	1.42 $\pm$ 0.09	+	0/6
	liquor	12724 $\pm$ 813	0.61 $\pm$ 0.23	1.38 $\pm$ 0.08	+	0/6
(8) QIAamp DNA Stool® Mini Kit from QIAGEN	pellet	841 $\pm$ 55	1.45 $\pm$ 0.07	1.99 $\pm$ 0.08	+/-	0/6
	liquor	646 $\pm$ 8	0.99 $\pm$ 0.01	2.00 $\pm$ 0.13	+/-	6/6
(9) DNA extraction including an acetone and petrol ether washing step, according to Purohit et al. (2003)	pellet	10763 $\pm$ 3211	1.12 $\pm$ 0.13	0.85 $\pm$ 0.04	+	0/6
	liquor	3178 $\pm$ 476	0.46 $\pm$ 0.16	0.74 $\pm$ 0.09	+	0/6
(10) DNA extraction according to Porteous et al. (1997). Two concentrations of guanidine isothiocyanate were tested: 5M for liquor #1 and 4M for the pellet and liquor #2 samples	pellet	2282 $\pm$ 69	1.34 $\pm$ 0.13	1.40 $\pm$ 0.22	+	0/6
	liquor (1)	503 $\pm$ 120	1.60 $\pm$ 0.12	1.70 $\pm$ 0.09	+	0/6
	liquor (2)	722 $\pm$ 283	2.07 $\pm$ 0.14	1.90 $\pm$ 0.13	+	6/6

^a All protocols were tested on a same aliquoted sample. Standard deviations were obtained from 6 independent repetitions of each procedure.

^b (-): low molecular weight DNA; (+): high molecular weight DNA; (+/-): intermediate-sized DNA, as exemplified in Fig. 1.

Table 3. Yield and purity of DNA extracted according to the protocol adapted from Porteous et al. (1997)

Type of sample (origin)	DNA yield (μg DNA / g dry matter)	DNA purity		DNA integrity ^b	PCR amplifi- cation
		A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}		
Activated sludge (WWTP 2)	797 ± 544	1.88 ± 0.18	1.94 ± 0.23	+	3/3
Activated sludge (WWTP 3)	783 ± 290	1.83 ± 0.18	1.88 ± 0.18	+	3/3
Anaerobic sludge (WWTP 4)	187 ± 89	1.78 ± 0.12	1.75 ± 0.21	+	3/3
Compressed sludge (WWTP5)	4.4 ± 1.2 ^a	1.80 ± 0.01	1.84 ± 0.09	+	3/3
River sediments (Moselle)	25 ± 5	1.96 ± 0.20	1.92 ± 0.12	+	3/3

^a DNA yield estimated in μg of DNA per g of wet matter.

^b (-): low molecular weight DNA; (+): high molecular weight DNA; (+/-): intermediate-sized DNA.

Table 3. Yield and purity of DNA extracted according to the protocol adapted from Porteous et al. (1997)

Type of sample (origin)	DNA yield (μg DNA / g dry matter)	DNA purity		DNA integrity ^b	PCR amplifi- cation
		A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}		
Activated sludge (WWTP 2)	797 ± 544	1.88 ± 0.18	1.94 ± 0.23	+	3/3
Activated sludge (WWTP 3)	783 ± 290	1.83 ± 0.18	1.88 ± 0.18	+	3/3
Anaerobic sludge (WWTP 4)	187 ± 89	1.78 ± 0.12	1.75 ± 0.21	+	3/3
Compressed sludge (WWTP5)	4.4 ± 1.2 ^a	1.80 ± 0.01	1.84 ± 0.09	+	3/3
River sediments (Moselle)	25 ± 5	1.96 ± 0.20	1.92 ± 0.12	+	3/3

^a DNA yield estimated in μg of DNA per g of wet matter.

^b (-): low molecular weight DNA; (+): high molecular weight DNA; (+/-): intermediate-sized DNA.

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Persistance et dissémination du plasmide pB10, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses bactériennes issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines

Résumé

L'utilisation massive des antibiotiques, depuis les années 50, génère une libération importante de ces molécules dans l'environnement (excrétion via les urines et les fèces) que l'on peut retrouver à des concentrations allant de 1 à 100 ng/L dans les eaux usées urbaines. Parce qu'elle réunit microorganismes résistants et antibiotiques, la station d'épuration d'eaux usées urbaines pourrait être une zone propice au transfert des gènes de résistance. Cependant, avec sa position stratégique à l'interface entre les activités humaines et l'environnement, la station d'épuration pourrait constituer un « rempart » contribuant à limiter leur dissémination dans l'environnement.

Les paramètres qui influencent ces transferts dans les stations d'épuration sont encore mal connus, en particulier du fait de limitations méthodologiques. Aussi l'objectif de notre travail était de déterminer les facteurs environnementaux influant sur la stabilité et le transfert d'un élément génétique mobile modèle, le plasmide pB10, dans des communautés bactériennes (biomasses de stations d'épuration et sédiments de rivière) maintenues en microcosmes. Jusqu'à présent, les transferts de gènes de résistance ont été principalement étudiés avec des méthodes reposant sur la culture de microorganismes sur milieux sélectifs, dont nous savons aujourd'hui qu'elles sous-estiment les phénomènes observés. Aussi, nous avons élaboré une approche basée sur la PCR quantitative pour détecter la dissémination d'un ADN mobile modèle amené via une bactérie hôte *E. coli* DH5 α . Les couples amorces/sondes très spécifiques ont pu être élaborés en tirant profit de la structure mosaïque du génome bactérien. L'approche proposée repose sur des mesures comparées du nombre de plasmide pB10 et de son hôte bactérien DH5 α au cours du temps, où une augmentation du rapport (pB10/DH5 α) implique une dissémination du plasmide vers les bactéries indigènes. Outre l'intérêt du développement méthodologique proposé, cette méthode a permis d'évaluer l'incidence de quelques paramètres environnementaux sur la dissémination d'un ADN au sein de communautés microbiennes complexes. Deux groupes de facteurs ont pu être distingués selon qu'ils influencent la persistance du plasmide pB10 dans les communautés dans son hôte initial (oxygénation/brassage, ajout d'antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices comme l'amoxicilline et le sulfaméthoxazole fréquemment retrouvés en station d'épuration) ou/et qu'ils favorisent sa dissémination dans les communautés bactériennes (biofilms, sédiments). Sans induire de transferts génétiques, les antibiotiques testés, même en concentrations sub-létales, pourraient participer à la dissémination de gènes de résistance en favorisant leur persistance.

Mots clés : antibiotiques, gènes de résistance, transferts horizontaux, stations d'épuration d'eaux usées urbaines, sédiments de rivière, PCR quantitative, plasmide pB10.