



HAL
open science

Les métaux lourds dans les écosystèmes anthropisés : une pression favorisant la sélection de pathogènes opportunistes résistants à des antibiotiques ?

Amélie Deredjian

► To cite this version:

Amélie Deredjian. Les métaux lourds dans les écosystèmes anthropisés : une pression favorisant la sélection de pathogènes opportunistes résistants à des antibiotiques ?. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10347 . tel-00834182

HAL Id: tel-00834182

<https://theses.hal.science/tel-00834182>

Submitted on 14 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Evolution Ecosystèmes Microbiologie et Modélisation

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2010

par

Amélie DEREDJIAN

**Les métaux lourds dans les écosystèmes anthropisés :
une pression favorisant la sélection de pathogènes opportunistes
résistants à des antibiotiques ?**

JURY :

Mme VALLAEYS Tatiana, Professeur, Université Montpellier II
M. SORENSEN Soren J, Professor, University of Copenhagen
Mme DIJOUX-FRANCA Marie-Geneviève, Professeur, ISPB, Université de Lyon
M. SIMONET Pascal, Directeur de recherche, CNRS
Mme NAZARET Sylvie, Chargée de recherche, CNRS
Mme FAVRE-BONTE Sabine, Maitre de conférences, Université de Lyon

Rapporteur
Rapporteur
Président du Jury
Examineur
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur L. Collet

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurance

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M R. Bernard

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie René Bally pour son accueil au sein du Laboratoire d'Ecologie Microbienne.

Je souhaite remercier Sylvie et Sabine pour m'avoir choisi pour ce sujet et guidé pendant ces trois années, je les remercie pour leurs conseils, leur encadrement, les discussions et pour les opportunités qu'elles m'ont données de présenter mon travail dans plusieurs congrès. Je remercie plus particulièrement Sylvie de s'être rendue disponible pour moi malgré un emploi du temps surchargé, en particulier ces derniers mois.

Je remercie également tous nos partenaires de Dijon, Paris, Tunisie et du Burkina Faso pour m'avoir permis de découvrir le terrain ou de bénéficier d'échantillons d'origine si variées qui ont contribué à l'originalité de mon étude.

Un grand merci à toute l'équipe 6, chercheurs, techniciens, thésards, post-docs, qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse. Je remercie Benoit Cournoyer pour son accueil dans l'équipe BPOE. Je remercie en particulier Céline pour nos discussions toujours constructives (qu'elles concernent le travail ou non...) et nos expéditions à Tours et en Suède, Manuelle pour sa présence, son soutien dans les moments difficiles et son amitié, Nolwenn, Stéphanie et Ina pour leur bonne humeur et leurs attentions, Claire pour sa gentillesse et sa disponibilité et Bruno pour son humour.

Un énorme merci à Babeth, pour tout ce qu'elle m'a appris au niveau technique, pour sa bonne humeur, ses chants, ses petites colères souvent associées à la dispersion de petits mots..., un grand merci pour son amitié sans faille et son soutien.

Je remercie également les stagiaires qui ont participé à l'obtention des résultats présentés dans ce manuscrit. Tout d'abord, Laurine pour sa participation aux travaux sur *Steno* et aussi pour sa bonne humeur. Je remercie également Charlotte et Charlyne pour leur contribution et surtout leur gentillesse et les fous rires qui ont parfois résulté de petits soucis de manipulation (je pense particulièrement à une pipette pas assez solide pour la force de Charlyne...).

Un grand merci à l'ensemble de l'UMR pour avoir partagé de près ou de loin ces trois années de thèse.

Enfin, je remercie ma famille : mes mamées, Josette, Louis, Fred et Chris pour leur présence et leurs encouragements et surtout mes parents qui ont toujours été là pour moi et m'ont toujours soutenu, je vous aime fort.

TABLE DES MATIERES

<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	3
<i>GENERAL INTRODUCTION (ENGLISH VERSION)</i>	11
<i>PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	19
<i>Pseudomonas aeruginosa et Stenotrophomonas maltophilia : complémentarité des deux modèles de bactéries pathogènes opportunistes</i>	19
I- Ecologie des modèles	23
I-1- Bactéries environnementales ubiquistes.....	23
I-1-a- Présence dans les milieux terrestres et aquatiques.....	24
• Distribution de <i>P. aeruginosa</i> dans les environnements naturels	24
• Distribution de <i>S. maltophilia</i> dans les environnements naturels	25
I-1-b- Présence dans les milieux pollués et capacité de bioremédiation.....	26
• Les eaux usées	26
• Les environnements contaminés en métaux lourds.....	27
• Les environnements contaminés en hydrocarbures.....	28
• Les environnements présentant d'autres types de contaminations	29
I-1-c- Présence dans les environnements hospitaliers	30
I-2- Interactions avec d'autres organismes.....	32
I-2-a- Interactions avec les plantes	32
I-2-b- Interactions avec les animaux	36
I-2-c- Interactions avec l'Homme	38
• Portage	38
• Infections causées par <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. maltophilia</i>	39
• <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. maltophilia</i> chez les personnes atteintes de mucoviscidose	43
II- Génome et structure génétique des populations de <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. maltophilia</i>	44
II-1- Structure génétique des populations	45
II-2- Le génome de <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. maltophilia</i>	48
II-2-a- Structures des génomes.....	50
II-2-b- Composition des génomes cœur et accessoire	53
III- Mécanismes impliqués dans la réussite de l'interaction avec l'hôte et l'environnement : Virulence et Résistances	58
III-1- Le pouvoir pathogène	58
III-1-a- Facteurs de virulence.....	58
III-1-b- Formation de biofilm.....	61
III-1-c- Communication entre cellule et Quorum sensing	64
III-2- Résistances	69
III-2-a- Résistance aux antibiotiques	69
• Résistance due à la réduction de la perméabilité membranaire	77
• Résistance due à l'inactivation enzymatique de l'antibiotique	80
• Résistance due la modification de la cible.....	82
• Résistance due à l'acquisition d'une nouvelle enzyme	83
• Phénotype hypermutable des souches de <i>P. aeruginosa</i>	83
III-2-b- Résistance aux métaux (ou éléments trace métalliques)	84
III-2-c- Co-sélection de résistance aux antibiotiques et aux métaux	86
Conclusion.....	87

<i>PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE</i>	89
<i>PART II : EXPERIMENTAL PART</i>	89
Chapitre 1 : Distribution des modèles <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> dans les sols, effets de l’anthropisation sur leur présence et leur abondance	91
Chapter 1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> distribution in soils, effects of anthropization on their presence and abundance	91
Introduction	92
Introduction (English version).....	97
“Different occurrence of the opportunistic pathogens <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> in soils”	101
ABSTRACT.....	102
INTRODUCTION.....	103
MATERIAL AND METHODS	105
Agricultural and industrial soils from France	105
Experimental sites with waste water irrigation	105
Experimental sites with organic amendment	107
Total bacterial counts	109
Isolation and identification of <i>P. aeruginosa</i>	109
Isolation and identification of <i>S. maltophilia</i>	110
DNA extraction from soil samples and PCR amplification	110
RESULTS	111
Isolates identification and selectivity of the media	111
Abundance of culturable <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> in soil samples	112
Prevalence of <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> in irrigated soil	117
Prevalence of <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> in soils amended with organic wastes	117
Detection of <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> in soil DNA extract	121
DISCUSSION	122
Selectivity of the media	122
Sporadic detection of <i>P. aeruginosa</i> in soil samples	124
Widespread occurrence of <i>S. maltophilia</i> in soil and influence of agricultural practices on its prevalence.....	127
Concluding remarks	129
ACKNOWLEDGMENTS	130
REFERENCES.....	130
Conclusions	139
Conclusions (English version).....	141
Chapitre 2 : Evaluation des phénomènes de co-sélection de résistance aux métaux et aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. maltophilia</i>	143
Chapter 2: Evaluation of heavy metal and antibiotic resistance co-selection in <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i>	143
Introduction.....	145
Introduction (English version).....	149
Partie 1 : Diversité de résistance aux métaux et aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. maltophilia</i> en fonction de l’origine des souches et des pressions de sélection	153
Part 1: Heavy metal and antibiotic resistance diversity in <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> depending on their origin and selective pressure.....	153
“Antibiotic and heavy metal resistance among hospital and environmental strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ”	155
ABSTRACT.....	155
INTRODUCTION.....	157
MATERIALS AND METHODS	159
Strains.....	159

Antibiotic resistance test.....	162
Heavy metal resistance profiles	162
Data analysis.....	163
Heavy metal resistance gene amplification.....	163
RESULTS	165
Antibiotic resistance profiles	165
Heavy metal resistance	167
Strains similarity based on antibiotic and heavy metal resistance.....	169
Presence of heavy metal resistance genes.....	169
DISCUSSION	171
ACKNOWLEDGMENTS	176
REFERENCES.....	177
“High phenotypic and genetic diversity of antibiotic and metal susceptibilities among hospital and environmental strains of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ”	183
ABSTRACT.....	184
INTRODUCTION.....	185
MATERIAL AND METHODS	187
Strains	187
Antibiotic resistance test.....	187
Heavy metal resistance profiles	190
Data analysis.....	190
Resistance genes amplification	190
RESULTS	191
Antibiotic resistance profile.....	191
Heavy metal resistance	194
Strains similarity based on antibiotic and heavy metal resistance.....	196
Prevalence of resistance genes	196
DISCUSSION	199
ACKNOWLEDGMENTS	205
REFERENCES.....	205
Conclusions	211
Conclusion (English version)	214
Partie 2 : Evaluation de la diversité du déterminant <i>merA</i> chez <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. maltophilia</i> , association avec les résistances aux antibiotiques	217
Part 2: <i>merA</i> genetic diversity in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> and relationship with antibiotic resistance.....	217
“ <i>merA</i> genetic diversity in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> and relationship with antibiotic resistance”	219
ABSTRACT.....	220
INTRODUCTION.....	221
MATERIALS AND METHODS	223
Strains	223
Mercury resistance and antibiotic resistance tests.....	223
PCR amplification	223
Plasmid profile and Southern hybridization	225
Restriction profiles and sequencing	226
Phylogenetic analysis	226
RESULTS	226
<i>merA</i> gene restriction profiles and genomic localization.....	226
<i>merA</i> gene sequence and phylogeny.....	228
Detection of PAGI-2 sequences	231
Relationship between <i>merA</i> profiles and resistance to antibiotics	231
DISCUSSION	231
ACKNOWLEDGMENTS	234

REFERENCES.....	234
Conclusions	239
Conclusions (English version)	241
Chapter 3: Effect of metallic and organic contaminations on the selection and maintenance of resistances in the indigenous microbial community of the site of Pierrelaye	243
Introduction	245
Introduction (English version)	246
“Detection of bacterial opportunistic pathogens among the antibiotic and heavy metal resistant isolates from a chronically heavy metal contaminated soil”	247
ABSTRACT	248
INTRODUCTION.....	249
MATERIAL AND METHODS	251
Study site and sample collection	251
Enumeration and isolation of heterotrophic bacteria from soil samples.....	252
Identification and antibiotic and heavy metal resistant phenotypes of resistant population ...	252
Resistance genes amplification	253
Cloning and sequencing amplified fragments.....	254
RESULTS	254
Prevalence of antibiotic and mercury resistant bacteria in the total heterotrophic microflora	254
Identification of resistant bacteria	257
Multi-resistant bacteria	259
Presence of resistance genes	260
DISCUSSION	260
ACKNOWLEDGMENTS	265
REFERENCES.....	266
Conclusions	271
Conclusions (English version)	274
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	279
CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES (ENGLISH VERSION)	285
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	291
REFERENCES	291
ANNEXES	315

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le résistome	4
Figure 2. Phénotype lié au résistome.....	4
Figure 3. Rôle des pompes à efflux dans les environnements cliniques et non cliniques.....	6
Figure 4. Exemples de co-sélection de résistance.....	8
Figure 5. The antibiotic resistome.....	12
Figure 6. Phenotype associated to the resistome.....	12
Figure 7. Role of efflux pumps in clinical and non clinical environments.....	13
Figure 8. Examples of resistance co-selection	15
Figure 9. Phylogénie bactérienne.....	22
Figure 10. Prévalence des infections bactériennes chez les patients atteints de mucoviscidose en fonction de l'âge	42
Figure 11. Co-infections rapportées dans les poumons de patients CF.....	42
Figure 12. Comparaisons des génomes séquencés de <i>P. aeruginosa</i>	51
Figure 13. Modèle schématique d'un îlot génomique bactérien	52
Figure 14. Comparaison des génomes séquencés de <i>S. maltophilia</i>	52
Figure 15. Les facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i>	59
Figure 16. Formation d'un biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	62
Figure 17. Principe de l'expression du quorum sensing au cours de la croissance bactérienne.....	65
Figure 18. L'architecture du biofilm formé par <i>P. aeruginosa</i> est influencée par les molécules DSF (Diffusible Signal Factors) produites par <i>S. maltophilia</i>	68
Figure 19. La découverte des antibiotiques	70
Figure 20. Modes d'action des antibiotiques.....	72
Figure 21. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	73
Figure 22. Présentation des sites étudiés.....	96
Figure 23. Studied sites in France, Burkina Faso and Tunisia.....	106
Figure 24. <i>S. maltophilia</i> counts in soils of the Burgundy region (RMQS) (A) and percentage in the total heterotrophic (B).....	116
Figure 25. <i>S. maltophilia</i> counts in soils from the site of Pierrelaye (A) and percentage in the total heterotrophic microflora (B).....	118
Figure 26. <i>S. maltophilia</i> counts in soils and amendment from the site of Feucherolles (A, C, E) and percentage of <i>S. maltophilia</i> in the total heterotrophic microflora (B, D, F), before amendment (A, B) 1 month after amendments (C, D) and in the amendments (E, F).....	119
Figure 27. <i>S. maltophilia</i> counts in soils from the sites in Burkina Faso (A) and percentage in the total heterotrophic microflora (B).....	120
Figure 28. Antibiotic multi-resistance in 76 environmental and 54 hospital strains of <i>P. aeruginosa</i> (A), within environmental strain sub-groups (B) and hospital strain sub-groups (C).....	164
Figure 29. Antibiotic resistance profiles in environmental and hospital strains of <i>P. aeruginosa</i> (A), within environmental strain sub-groups (B) and hospital strain sub-groups (C).....	166
Figure 30. Heavy metal resistance in environmental and hospital strains of <i>P. aeruginosa</i> (A), within environmental strain sub-groups (B) and strain hospital sub-groups (C).....	168
Figure 31. Dendrogram showing the relationships between <i>P. aeruginosa</i> strains based on antibiotic and heavy metal resistance data.....	170
Figure 32. Antibiotic multi-resistance in 52 environmental and 27 hospital strains of <i>S. maltophilia</i> (A), within environmental and hospital strain sub-groups (B).....	192

Figure 33. Antibiotic resistance profiles in 52 environmental and 27 hospital strains of <i>S. maltophilia</i> (A), within environmental and hospital strain sub-groups (B).....	193
Figure 34. Heavy metal resistance in 52 environmental and 27 hospital strains of <i>S. maltophilia</i> (A), within environmental and hospital strain sub-groups (B).....	195
Figure 35. Principal component analysis done with antibiotic and heavy metal resistance phenotype.....	197
Figure 36. Prevalence of antibiotic (A) and heavy metal (B) resistance genes in <i>S. maltophilia</i> strains.....	198
Figure 37. Positioning of <i>merA</i> determinants (profile) found among <i>P. aeruginosa</i> (Pa) and <i>S. maltophilia</i> (Sm) in the phylogeny of the <i>merA</i> gene.	230
Figure 38. Numbers (colony forming unit g-1) of viable heterotrophic bacteria in soil samples.	255
Figure 39. Numbers (colony forming unit g-1) of antibiotic (A) and Hg (C) heterotrophic resistant bacteria in soil samples and proportion (%) of resistant bacteria in the total heterotrophic microflora (B and D).....	256
Figure 40. Identification of selected resistant isolates.....	258

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Source de <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. maltophilia</i> dans l'environnement hospitalier (non exhaustif).....	31
Tableau 2. Infections causées par <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. maltophilia</i>	40
Tableau 3. Caractéristiques générales des génomes séquencés de <i>P. aeruginosa</i>	50
Tableau 4. Ilots génomiques de fonction connue présents chez <i>S. maltophilia</i>	57
Tableau 5. Classification des antibiotiques par familles de molécules.....	70
Tableau 6. Bilan des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i>	74
Tableau 7. Bilan des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>S. maltophilia</i>	75
Tableau 8. Substrats des pompes à efflux présentes chez <i>P. aeruginosa</i>	78
Tableau 9. Impact des mutations sur les gènes codant pour les pompes à efflux sur les résistances aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i>	78
Tableau 10. Mécanismes de résistances acquises chez <i>P. aeruginosa</i>	79
Table 1. Physicochemical characteristics of soils sampled from the control fields at different sites en France, Tunisia and Burkina Faso.....	108
Table 2. Number of CFU (colony forming unit) of <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> , in agricultural and industrial soils sampled from various French regions.....	113
Table 3. Number of CFU (colony forming unit) of <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> , in soils exposed to irrigation with waste water in the French and Tunisian sites.....	114
Table 4. Number of CFU (colony forming unit) of <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> , in soils exposed to organic amendment in France, and Burkina Faso.....	115
Table 5. Strains of <i>P. aeruginosa</i> isolated from environment and hospital.....	160
Table 6. PCR primers used for screening heavy metal resistance genes.....	163
Table 7. Mercury resistance phenotype and genotype.....	171
Table 8. Strains of <i>S. maltophilia</i> isolated from the hospital and the environment.....	188
Table 9. Soil characteristics.....	189
Table 10. Primers used in the study.....	191
Table 11. Strains used in this study.....	224
Table 12. List of primers.....	224
Table 13. Abundance (in percent) of the mercury resistance phenotype among <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> strains.....	227
Table 14. Abundance (in percent) of the <i>merA</i> -like gene among <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> strains and distribution of the various profiles depending on strain origin.....	227
Table 15. Homology between the <i>merA</i> -like sequences detected among <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> strains and the <i>merA</i> sequences available in GenBank.....	229
Table 16. Screening of the PGI-2 sequences among the <i>P. aeruginosa</i> and <i>S. maltophilia</i> strains carrying <i>merA</i> -like sequence.....	229
Table 17. Physicochemical characteristics of soil samples from the Pierrelaye-Bessancourt plain.....	251
Table 18. Primers used in this study.....	253
Table 19. Diversity of resistant bacteria.....	258
Table 20. Multi-resistance in the selected resistant isolates.....	260

INTRODUCTION GENERALE

GENERAL INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, un nombre croissant d'espèces bactériennes connues pour leur distribution ubiquiste dans l'environnement sont impliquées dans des infections nosocomiales (acquises à l'hôpital) et intègre la liste des pathogènes opportunistes (Martinez & Baquero, 2002). Ces bactéries profitent des faiblesses de leur hôte pour manifester leur pouvoir pathogène et infectent des personnes fragilisées, population en augmentation du fait du vieillissement de la population et de l'augmentation du nombre de personnes immunodéprimées (greffe, VIH, cancer...). De plus, ces bactéries sont particulièrement difficiles à éradiquer du fait qu'elles présentent fréquemment une multi-résistance aux antibiotiques. Elles constituent de ce fait un problème majeur de santé publique. Ces résistances sont essentiellement permises par quatre mécanismes : la réduction de la perméabilité membranaire, l'efflux, la modification de la cible et l'inactivation de l'antibiotique (Levy & Marshall, 2004). Les déterminants génétiques impliqués dans ces mécanismes sont soit présents dans le génome de la bactérie, on parle alors de résistance intrinsèque ; soit acquis suite à un transfert horizontal ou une mutation sélectionnés sous l'effet d'une pression de sélection, on parle alors de résistance acquise (Livermore, 2003). Il est aujourd'hui admis que l'utilisation excessive et inadaptée des antibiotiques en milieu hospitalier a exercé une pression favorisant l'acquisition de ces résistances et a largement contribué à l'émergence et la dispersion des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Slama, 2008). Cette prise de conscience a mené à une utilisation plus modérée et adéquate des antibiotiques en milieu clinique qui semble toutefois n'avoir qu'un effet modéré sur la réduction de la fréquence d'isolement de ces bactéries (Cook, *et al.*, 2004).

De fait, la communauté scientifique a porté un intérêt croissant ces dernières années à l'étude des résistances aux antibiotiques dans l'environnement. Ainsi, des bactéries résistantes aux antibiotiques ont été identifiées dans différents écosystèmes tels que le sol ou le milieu aquatique. Notamment, des travaux récents ont mis en évidence au sein des communautés bactériennes indigènes des sols l'existence d'une importante diversité de gènes de résistance aux antibiotiques appelée résistome et qui englobe les gènes réellement responsables de la résistance, les gènes de résistance dits cryptiques qui ne conduisent pas au phénotype, et les gènes précurseurs des déterminants de résistance (Figures 1 et 2) (D'Costa, *et al.*, 2007, Fajardo, *et al.*, 2008).

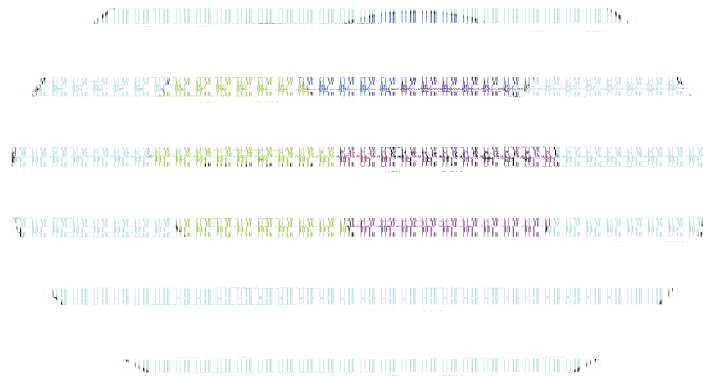


Figure 1. Le résistome. Le résistome est l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques. Il inclut les éléments présents chez les bactéries pathogènes et chez les bactéries productrices d'antibiotiques, ainsi que les gènes cryptiques (qui ne sont pas nécessairement exprimés) présents sur les chromosomes bactériens (D'après Wright *et al.*, 2007).

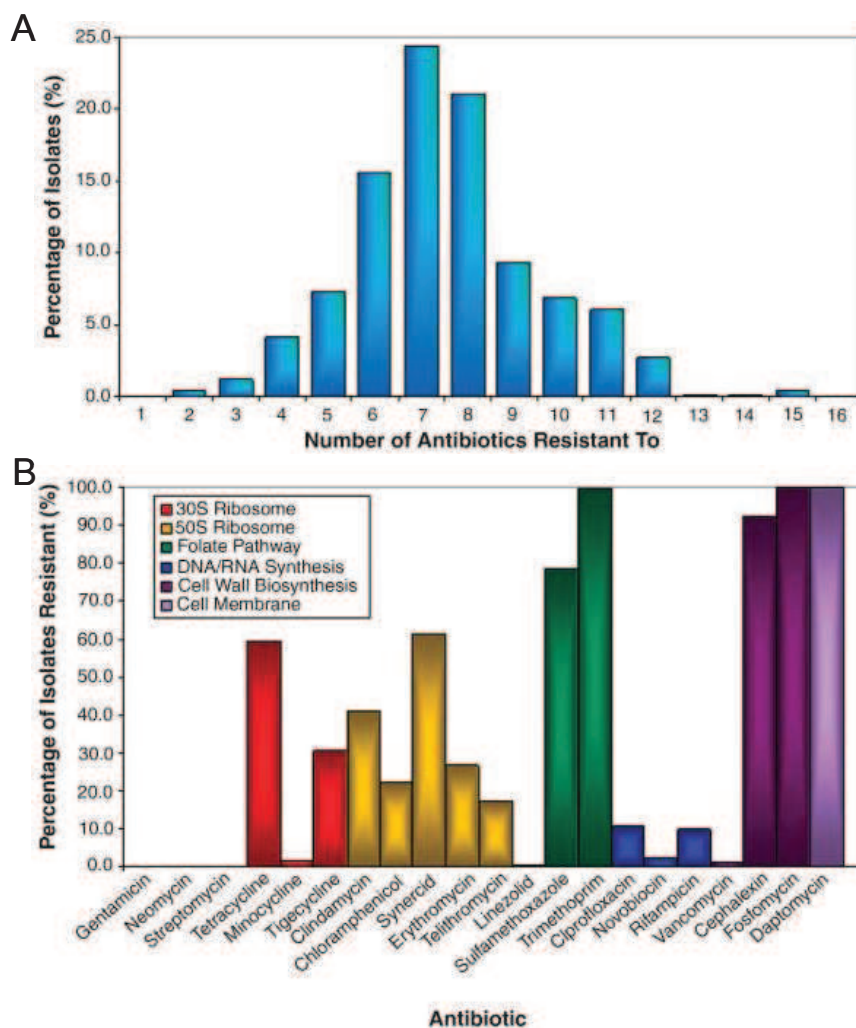


Figure 2. Phénotype lié au résistome. Profil de résistance de 480 bactéries du sol. A- Spectre de résistance ; B- Niveau de résistance de chaque antibiotique d'intérêt (D'Costa *et al.*, 2006).

De même, une analyse *in silico* menée sur près de 1000 génomes de bactéries aquatiques et métagénomes d'origine marine a mis en évidence la présence de plusieurs déterminants *qnr*, permettant la résistance aux quinolones, antibiotiques de synthèse (Sanchez, *et al.*, 2008). Ces déterminants ont été obtenus dans 22 génomes appartenant à 8 genres différents, suggérant une large dispersion de ces gènes. Contrairement à ce que l'on peut observer en milieu clinique, les gènes identifiés dans cette étude ont une position chromosomique (acquisition ancienne), ce qui soulève la question de leur rôle dans l'environnement. Ainsi, malgré une grande diversité des déterminants génétiques ainsi que leur large dispersion, l'origine, l'importance et le rôle des résistances aux antibiotiques dans l'environnement font l'objet de nombreux questionnements.

La présence d'antibiotiques dans l'environnement pourrait être à l'origine de l'acquisition de ces résistances. Cette présence s'explique d'une part par une production des bactéries indigènes. Plus de 80 % des antibiotiques utilisés en milieu clinique (utilisation directe ou sous forme de dérivés semi-synthétiques) proviennent de bactéries du sol, en particulier des Actinomycètes (Watve, *et al.*, 2001). Il est aujourd'hui accepté que le rôle des antibiotiques produits par ces bactéries soit d'inhiber la croissance des compétiteurs. De même, les déterminants permettant la résistance aux antibiotiques sont sélectionnés en réponse à cette production (Martinez, 2009). Toutefois un rôle alternatif est suggéré par différentes études. Les antibiotiques pourraient notamment avoir un effet bénéfique à faible concentration (ou concentration sub-inhibitrice) en jouant le rôle de molécule signal, induisant des modifications de l'expression de certains gènes. Ces gènes sont notamment impliqués dans la synthèse et le transport de certaines molécules ou dans le transfert de gènes, et façonneraient ainsi la structure de la communauté (Davies, *et al.*, 2006).

D'autre part, certaines activités anthropiques ont participé à la forte augmentation des concentrations en antibiotiques dans les écosystèmes naturels. C'est le cas par exemple de l'utilisation dans les élevages des antibiotiques comme facteur de croissance ou bien de leur utilisation inadaptée en thérapie humaine et animale. Les antibiotiques consommés ne sont que partiellement métabolisés et vont être dispersés par les déjections dans différents écosystèmes tels que les stations d'épuration ou directement dans les eaux ou le sol. En plus de l'acquisition de résistance par transfert horizontal, cette forte augmentation pourrait entraîner dans les populations bactériennes indigènes le changement de fonction de certaines protéines en faveur de la résistance et de la protection de la cellule. En effet, il a été observé que certains éléments participant à la résistance à d'importantes concentrations en antibiotiques ont des fonctions différentes chez leur hôte originel tel que la biosynthèse de

macromolécules, le maintien de l'homéostasie, ou la réponse au signal (Martinez, *et al.*, 2009). C'est le cas de certaines pompes à efflux (Figure 3) qui permettent la résistance aux antibiotiques chez des bactéries pathogènes mais pas dans l'organisme d'origine (Martinez, *et al.*, 2009). Par exemple, le gène *mefA*, codant pour une protéine d'efflux, permet exclusivement la résistance aux macrolides lorsqu'il est acquis par transfert horizontal par des bactéries pathogènes alors que sa fonction est inconnue chez la bactérie dans laquelle il a été mis en évidence (Clancy, *et al.*, 1996).



Figure 3. Rôle des pompes à efflux dans les environnements cliniques et non cliniques (Martinez *et al.*, 2009).

Il apparait de plus en plus clairement que la présence d'autres composés entrainant des conditions de stress pour les communautés bactériennes indigènes serait impliquée dans l'acquisition de mécanismes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Notamment, des études suggèrent que la contamination par les métaux des écosystèmes naturels, anthropisés ou créés par l'Homme, représenterait une force évolutive importante pour la sélection de ces résistances.

La toxicité des métaux vis-à-vis des organismes peut entraîner en cas de pollution des écosystèmes des modifications structurales et fonctionnelles des communautés présentes. Ces modifications résultent de la mise en place de mécanismes d'adaptation intervenant soit à l'échelle des cellules (expression de gènes, activité enzymatique,...) soit à l'échelle des populations (transferts de gènes). Ainsi, diverses études ont pu mettre en évidence dans des sols, des sédiments ou des milieux aquatiques contaminés aux métaux, une plus forte proportion de bactéries résistantes (Roane & Kellogg, 1996, Nazaret, *et al.*, 2003). Les mécanismes cellulaires responsables de ces résistances font intervenir des systèmes semblables à ceux impliqués dans la résistance aux antibiotiques tels que des systèmes d'efflux, de séquestration, de réduction de la perméabilité membranaire ou de modification de spéciation de l'élément (Nies, 1999). D'autre part, différentes études montrent une corrélation positive entre la présence de métaux dans un écosystème et la résistance à la fois à ces métaux et aux antibiotiques chez les bactéries indigènes, ceci indépendamment du métal ou de l'antibiotique (Baker-Austin, *et al.*, 2006). De telles observations ont été faites dans des milieux aussi variés que le tube digestif ou les plaques dentaires (usage du mercure dans les amalgames dentaires) (Summers, *et al.*, 1993, Ready, *et al.*, 2007), le milieu aquatique (Filali, *et al.*, 2000, Stepanauskas, *et al.*, 2005), les sédiments (Rasmussen & Sorensen, 1998) et le sol (Lighthart, 1979). Cette co-sélection peut se faire selon trois mécanismes : la co-résistance, la résistance croisée et la co-régulation (Figure 4) (Baker-Austin, *et al.*, 2006) :

- La co-résistance est observée lorsque les gènes de résistance aux métaux et aux antibiotiques sont positionnés sur le même élément génétique mobile (plasmide, transposon, îlot génomique), ainsi, la présence d'un métal pourra sélectionner les deux résistances. Par exemple, les gènes de résistance au mercure (opéron *merRTPA*) sont fréquemment portés par des éléments génétiques mobiles et associés à des gènes de résistance aux antibiotiques. Notamment, le transposon Tn21 est connu pour porter à la fois l'opéron *merRTPA* et le gène *aadI* à l'origine de la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine. Des études ont montré la présence de ce transposon à la fois chez des bactéries du sol, aquatiques et cliniques (Liebert, *et al.*, 1999).

- La résistance croisée est observée lorsque le même mécanisme de résistance permet à la fois la résistance à un métal et à un antibiotique. C'est notamment le cas de certaines pompes à efflux telle que MexGHI-OpmD présente chez *P. aeruginosa*, qui permet d'effluer le vanadium ainsi que la tétracycline et la ticarcilline associée à l'acide clavulanique (Aendekerk, *et al.*, 2002).

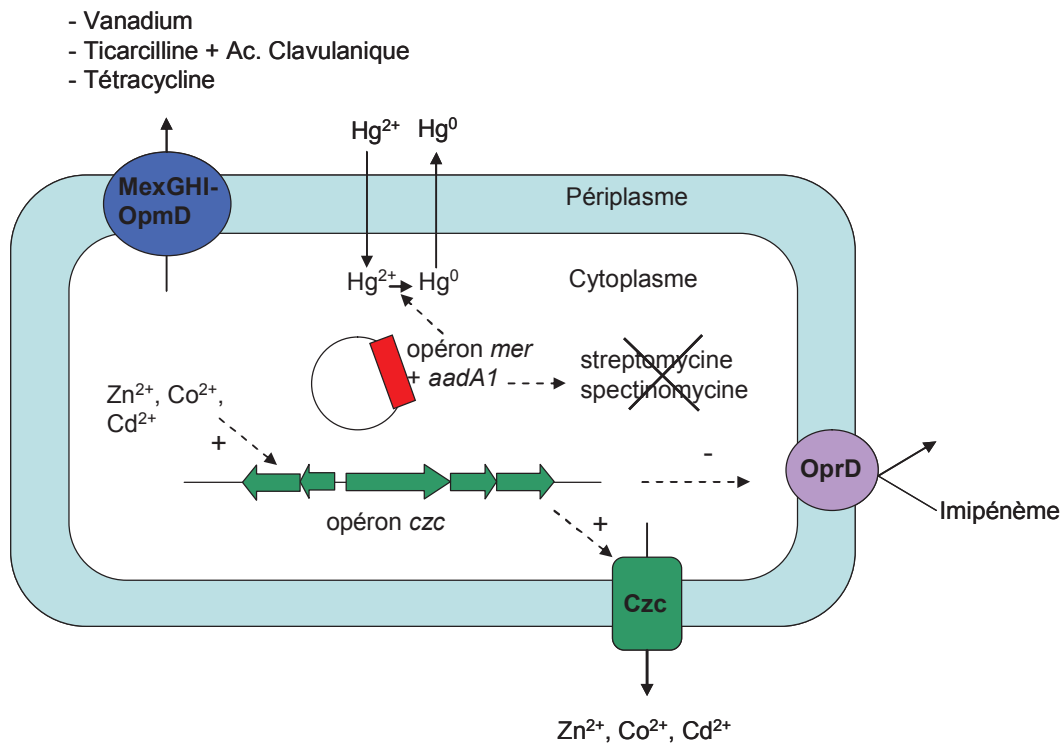


Figure 4. Exemples de co-sélection de résistance. D'après Baker-Austin *et al.*, 2006.

▪ La co-régulation, quant à elle, s'observe lorsque la régulation d'un mécanisme, induite par la présence d'un métal ou d'un antibiotique, régule également un autre mécanisme, permettant ainsi les deux résistances. Par exemple, Perron et collaborateurs ont montré que la présence de zinc sélectionne des souches de *P. aeruginosa* résistantes à la fois à différents métaux : zinc, cadmium et cobalt et à l'imipénème, antibiotique de la famille des carbapénèmes. Cette double résistance implique le système de régulation à deux composants CzcR/CzcS qui en présence du métal va d'une part, induire l'expression de la pompe à efflux CzcCBA permettant l'efflux du zinc, cadmium et cobalt et d'autre part réprimer l'expression de la porine OprD, responsable notamment de l'entrée de l'imipénème dans la cellule (Perron, *et al.*, 2004).

Les sols, bien que réceptacle et accumulateur de métaux lourds du fait de certaines activités anthropiques telles que l'apport de cuivre dans le traitement des vignobles, les apports polymétalliques lors de l'épandage de boues de stations d'épuration ou les exploitations minières et industrielles, ont fait l'objet d'une moindre attention que les environnements aquatiques. Pourtant, certains travaux, notamment ceux de Berg et collaborateurs ont mis en évidence une corrélation entre présence d'un métal et la double résistance métal/antibiotique. Cette étude compare des communautés bactériennes isolées d'un sol témoin et d'un sol pollué au cuivre, et démontre qu'il y a plus de bactéries résistantes au cuivre dans le sol contaminé sans changer le nombre total de bactéries et plus de bactéries résistantes aux antibiotiques dans ce milieu avec une plus forte tendance à la multi-résistance (résistance à au moins 3 antibiotiques) (Berg, *et al.*, 2005).

De même, la majorité des études environnementales s'intéressant à ce phénomène prennent en compte les communautés indigènes dans leur totalité sans apporter d'attention particulière aux bactéries pathogènes opportunistes. Au vu de leur implication en santé publique, il semble indispensable d'approfondir les connaissances sur l'impact des pressions anthropiques, en particulier des pollutions métalliques sur la sélection de résistance aux antibiotiques chez ces bactéries.

Dans ce contexte, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a pour objectif de mieux appréhender le rôle des métaux dans les sols sur la co-sélection de résistance aux métaux et aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes opportunistes. Pour réaliser ce travail, nous avons choisi deux modèles bactériens pour leur ubiquité dans l'environnement et leur fort impact en santé publique : *Pseudomonas aeruginosa* et *Stenotrophomonas maltophilia*. La première partie de ce manuscrit est une étude bibliographique qui a pour but de présenter ces modèles et de montrer leur complémentarité dans cette étude. L'accent est mis sur l'ubiquité de ces bactéries, présentes à la fois dans des environnements variés (milieux aquatiques, sol, environnements extrêmes ou pollués) et dans le milieu clinique (infections, pouvoir pathogène, virulence). Nous verrons également que le séquençage récent des génomes de plusieurs souches a permis de mieux appréhender le mode de vie de ces pathogènes opportunistes. La diversité intra-spécifique des modèles est abordée grâce à différentes études de génétique des populations. Une importance particulière est apportée à leur capacité de résistance aux antibiotiques et aux métaux, quelles soient intrinsèques ou bien acquises par transfert horizontal.

La partie expérimentale de cette thèse est divisée en trois chapitres. Dans le premier chapitre, l'évaluation de la présence, la distribution et l'abondance des modèles a été réalisée par méthode cultivable couplée à la vérification de l'identité des isolats par des outils de biologie moléculaire sur un large panel de sols d'origines géographiques différentes (France, Tunisie, Burkina Faso), soumis à des climats différents et présentant ainsi des caractéristiques physico-chimiques et des couverts végétaux différents. Ces sols sont soumis à différentes activités anthropiques, industrielles et agricoles, influençant la composition biochimique et microbiologique du sol. Cette étude a également pour objectif d'identifier des conditions ayant une influence sur la présence et l'abondance des modèles telles que la présence de molécules organiques ou de métaux lourds liée aux activités agricoles ou industrielles menées sur ces sols.

Dans le deuxième chapitre, les phénotypes et génotypes de résistance aux métaux et aux antibiotiques des souches environnementales isolées des sites étudiés dans le chapitre précédent ont été déterminés et comparés aux capacités de résistance de souches d'origine hospitalière afin de mettre en évidence des pressions environnementales favorables à la sélection et/ou au maintien de ces résistances ainsi que des phénomènes de co-sélection de résistance aux métaux et aux antibiotiques.

Dans le troisième chapitre, une étude plus globale des capacités de résistance aux métaux et aux antibiotiques de la communauté indigène du site de Pierrelaye, considéré dans notre étude comme le plus contaminé en métaux lourds, a été réalisée par méthode phénotypique. Les isolats considérés comme représentants de la communauté résistante aux métaux et aux antibiotiques ont été identifiés. La présence de gènes potentiellement impliqués dans ces résistances et fréquemment retrouvés sur des éléments génétiques mobiles chez des isolats cliniques a été investiguée par PCR chez les représentants de la communauté résistante de Pierrelaye ainsi que dans l'ADN total extrait des sols.

Enfin, une conclusion générale sur le travail réalisé permettra de faire le point sur les avancées obtenues au cours de cette thèse et des perspectives seront proposées.

GENERAL INTRODUCTION (English version)

Nowadays, an increasing number of bacterial species broadly distributed in the environment are in the causative agents of nosocomial infections (hospital acquired infections) and join the already long list of opportunistic pathogens (Martinez & Baquero, 2002). These bacteria take advantage of a failure in the immune system of fragilised people, as immunocompromised people (graft, HIV, cancer...), to express their pathogenicity. Moreover, these bacteria are particularly hard to eradicate due to their frequent antibiotic multi-resistance, constituting a major problem in modern medicine. Four mechanisms are responsible of antibiotic resistance: reduction of the membrane permeability, efflux, target modification and antibiotic inactivation (Levy & Marshall, 2004). These mechanisms can be encoded by genetic determinants present in the genome of the bacterium, also defined as intrinsic resistance or can be acquired by horizontal transfer or mutation selected by a selective pressure and defined as acquired resistance (Livermore, 2003). It is now accepted that excessive and inappropriate use of antibiotics in the hospital has played the role of selective pressure, promoting the acquisition of resistance and has largely contributed to the emergence and spread of antibiotic multi-resistant bacteria (Slama, 2008). This conclusion has led to a moderate and more appropriate antibiotic use in clinical settings which has just a slight effect on the reduction of resistant bacteria isolation (Cook, *et al.*, 2004).

Thus, antibiotic resistance in the environment is increasingly studied and antibiotic resistant bacteria are found in various terrestrial and aquatic environments. Recent works highlighted a highly diverse collection of antibiotic resistance genes in the soil microbial community, called resistome. This resistome is composed of genes responsible of antibiotic resistance phenotypes, cryptic genes and precursors present in both pathogenic and antibiotic producing bacteria (Figures 5 and 6) (D'Costa, *et al.*, 2007, Fajardo, *et al.*, 2008). An *in silico* analysis, conducted on near 1000 aquatic bacterial genomes and metagenomes revealed the presence of several *qnr* determinants, allowing quinolone (synthetic antibiotics) resistance (Sanchez, *et al.*, 2008). These determinants were obtained from 22 genomes belonging to 8 genera, suggesting a large spread of these genes. The genes identified in this study have a chromosomal position (ancient acquisition), whereas resistance in clinical strains originated from recent acquisition. This observation raises the question of the role of antibiotic resistance genes in the environment. Despite a wide diversity of genetic determinants and their wide dispersal, questions about the origin, the importance and the role of antibiotic resistance in the environment still remain.

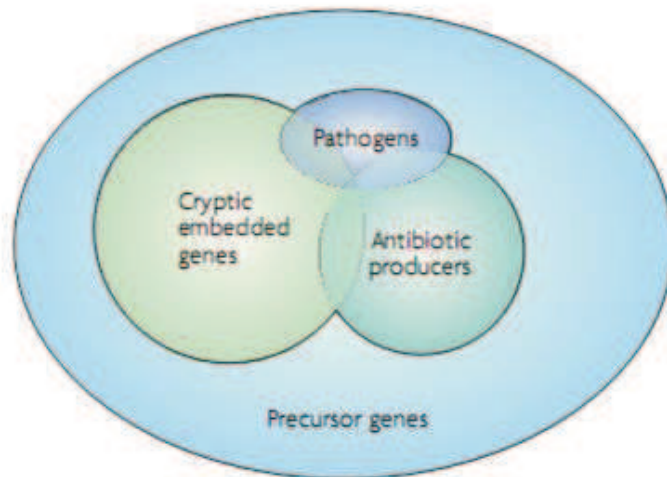


Figure 5. The antibiotic resistome. The resistome comprises all antibiotic resistance genes. It includes resistance elements found in both pathogenic bacteria and antibiotic-producing bacteria and cryptic resistance genes (which are not necessarily expressed) that are present in bacterial chromosomes (Wright *et al.*, 2007).

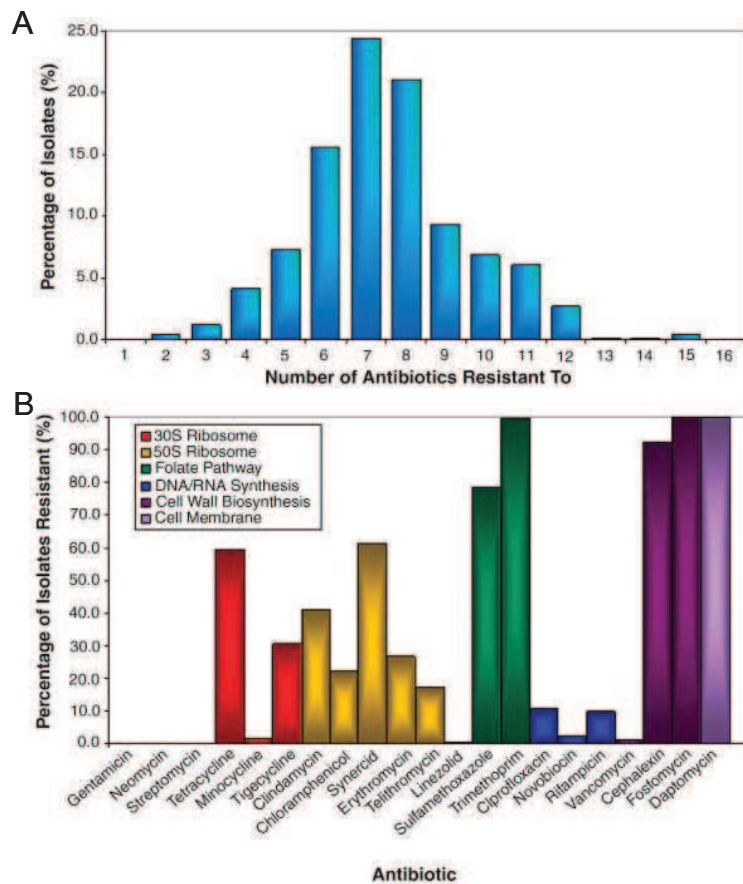


Figure 6. Phenotype associated to the resistome. Antibiotic resistance profiling of 480 soil-derived bacterial isolates; A- Schematic diagram illustrating the phenotypic density and diversity of resistance profiles; B- Resistance spectrum of soil isolates (D'Costa *et al.*, 2006).

The presence of antibiotics in the environment could be responsible of the acquisition of resistance. This presence can be partly explained by the production of indigenous bacteria. More than 80 % of antibiotics used in the hospital (direct use or semi-synthetic derivatives) are produced by soil bacteria, especially Actinomycetes (Watve, *et al.*, 2001). It is now admitted that antibiotics produced by bacteria have an inhibitor effect on the competitor growth. Genetic determinants implicated in resistance are selected in response to this production (Martinez, 2009). However, an alternative role is suggested by different studies. Antibiotic could have a beneficial effect at low concentration (or sub-inhibitory concentration) playing the role of signal molecules, inducing changes in gene expression. Genes implicated in synthesis and transports or gene transfers are concerned by this regulation, participating to shape the community structure (Davies *et al.*, 2006).

Anthropogenic activities, such as antibiotic use as growth factor in livestock or in human and animal therapy, could also contribute to the increase of antibiotic concentrations in natural ecosystems. Consumed antibiotics are only partially metabolized and can be spread by manure in different ecosystems such as wastewater treatment plant system or directly into water or soil. This increase leads to acquisition of resistance by horizontal transfer but could also lead to the modification of protein function in order to protect the bacterial cell. Indeed, some cell components, involved in resistance in presence of high antibiotic concentrations, have different function in the original host as the biosynthesis of macromolecules, the maintenance of homeostasis or the response to the signal (Martinez, *et al.*, 2009). As an example, some efflux pumps (Figure 7) are involved in resistance in pathogenic bacteria but not in the original organism (Martinez *et al.*, 2009).

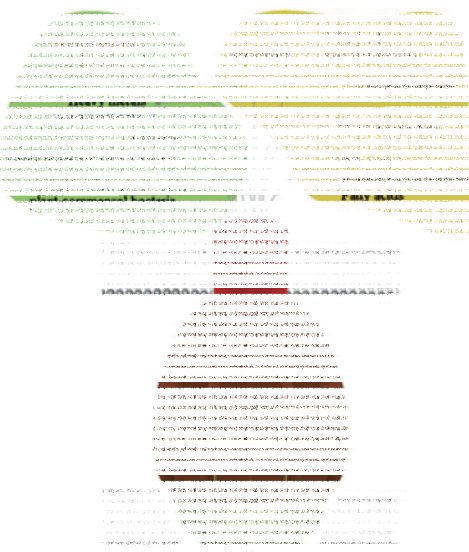


Figure 7. Role of efflux pumps in clinical and non clinical environments (Martinez *et al.*, 2009).

For instance the *mefA* gene, encoding an efflux protein, allows resistance to macrolides when acquired by horizontal gene transfer but has an unknown function in the bacterium from which it has been first highlighted (Clancy, *et al.*, 1996).

Other compounds leading to stress conditions in indigenous bacterial community could be implicated in the acquisition of antibiotic resistance mechanisms in the environment. Heavy metal contamination in natural, anthropogenic or Man-made environments could represent an important evolutionary force for resistance selection. Heavy metal toxicity in polluted ecosystems can lead to structural and functional changes in indigenous communities. These changes involved adaptation processes which occur at the cell level (gene expression, enzymatic activities...) or at the population level (selection and enrichment in tolerant/resistant population, gene transfer).

Several studies have already highlighted the presence of a higher proportion of resistant bacteria in contaminated soils, sediments or water (Roane & Kellogg, 1996, Nazaret, *et al.*, 2003). Mechanisms involved in heavy metal resistance as efflux, sequestration, element modification or reduction of the membrane permeability, are similar to mechanisms involved in antibiotic resistance (Nies, 1999). Moreover, studies have shown a positive correlation between heavy metal presence and antibiotic resistance in the indigenous bacterial community, independently of the metal and the antibiotic (Baker-Austin, *et al.*, 2006). Such observations were done in a variety of environments as the gastrointestinal tract, the oral flora (mercury use in dental amalgam) (Summers, *et al.*, 1993, Ready, *et al.*, 2007), soils (Lighthart, 1979), sediments (Rasmussen & Sorensen, 1998) or aquatic ecosystems (Filali, *et al.*, 2000, Stepanauskas, *et al.*, 2005). This co-selection can occur in 3 ways: co-resistance, cross-resistance and co-regulation (Figure 8) (Baker-Austin, *et al.*, 2006):

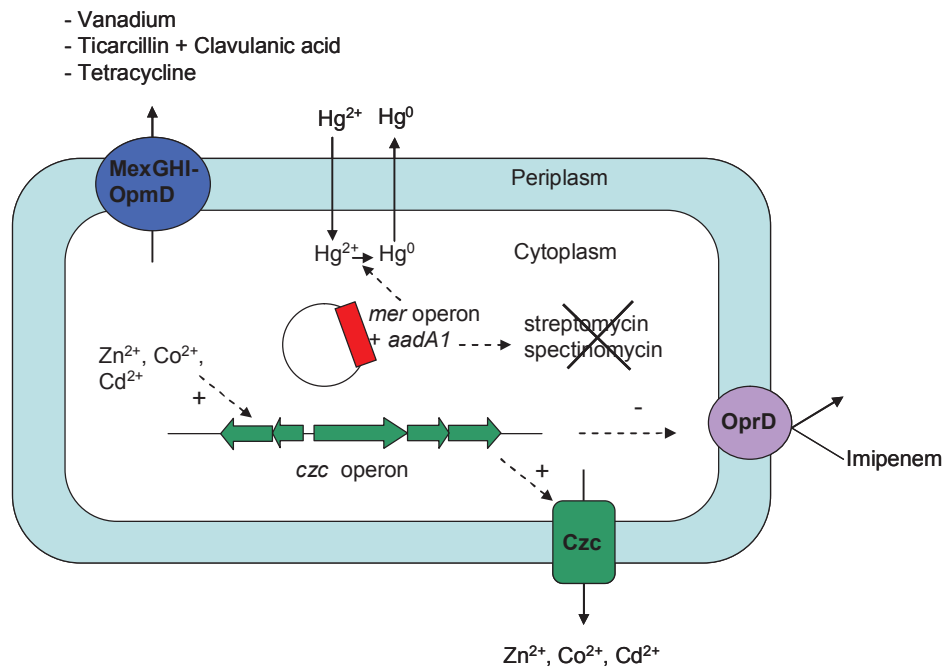


Figure 8. Examples of resistance co-selection (from Baker-Austin *et al.*, 2006).

- Co-resistance is observed when antibiotic and heavy metal resistance genes are present on the same mobile genetic element (plasmid, transposon, integron, genomic island...), so presence of the metal selects both resistances. For example, mercury resistance genes (operon *merRTPA*) are frequently positioned on mobile element and associated to antibiotic resistance genes. The Tn21 transposon is known to contain the *mer* operon and the *aad1* gene allowing resistance to streptomycin and spectinomycin. This transposon is present in bacteria from soil, water and hospital (Liebert, *et al.*, 1999).

- Cross-resistance is observed when the same mechanism allows both antibiotic and heavy metal resistances. In particular, it can be the case of efflux pumps as MexGHI-OpmD in *P. aeruginosa* responsible of the efflux of vanadium and tetracycline and ticarcillin associated to clavulanic acid (Aendekerk, *et al.*, 2002).

Co-regulation is observed when one regulatory system regulates both resistance mechanisms in presence of a metal or an antibiotic. As an example, Perron and collaborators (2004) showed that presence of zinc selected *P. aeruginosa* strains resistant to metals as zinc, cadmium and cobalt and to the imipenem antibiotic (carbapenem). These resistances imply the CzcR/CzcS two component regulatory system. In presence of a metal, this system induces the expression of the CzcCBA efflux pump, permitting the efflux of zinc, cadmium and cobalt and represses the expression of the OprD porin, responsible of the intake of imipenem.

Soils can be considered as receiver and accumulator of heavy metals due to anthropogenic activities such as copper intake in the treatment of vineyards, poly-metallic intakes during spreading of sludge from treatment plant system or industry and mining. Nevertheless, they received less attention than aquatic environments. The study of Berg and collaborators showed a positive correlation between presence of copper in soil and double resistance metal / antibiotic. This study highlighted a higher prevalence of copper resistant bacteria in copper contaminated soil than in non contaminated soil, associated to a higher tendency of multi-resistance (resistance to at least 3 antibiotics) (Berg, *et al.*, 2005). Similarly, most of the environmental studies dealing with this phenomenon take into account the entire bacterial communities without particular interest to opportunistic bacterial pathogen populations. Given their implication in public health, it seems necessary to increase knowledge about the role of anthropogenic pressure, especially heavy metal pollution, on the selection of antibiotic resistance in these populations.

In this context, the objectives of this thesis were to explore the role of metals in soils on co-selection of resistance to metals and antibiotics among opportunistic pathogen bacteria. To achieve that, we focus on two bacterial models, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*, chosen for their ubiquity in the environment and their high impact in public health. The first part of this manuscript is a review of the literature which aims at presenting these models and their complementarity. A particular interest is brought to the ubiquity of these bacteria, present in various environments (aquatic environments, soils, polluted and extreme environments) and in the hospital (infections, pathogenicity, virulence). We also present data from the recent sequencing of the genome of several strains which enables a better understanding of the way of life of these opportunistic pathogens. The intra-specific diversity of the two models is addressed through different studies of population genetic. Finally, their intrinsic and acquired antibiotic and heavy metal resistance capacities are largely described.

The second part of this manuscript is dedicated to data derived from the experimental work I conducted during the 3 years of my Ph.D. Data are then presented in three chapters. In the first chapter, evaluation of the presence, the distribution and the abundance of the two models was investigated in a wide range of soils from different geographical origins (France, Tunisia, and Burkina Faso), submitted to different climates, presenting different physicochemical

properties and different plant cover. These soils are also exposed to different industrial and agricultural activities that influence the biochemical and microbiological composition of the soils. The methodology used to assess the prevalence of the pathogens involved cultivable methods coupled to the verification of the identity of the isolates based on molecular tools as well as a culture independent approach (semi-quantitative PCR). This study also aimed at identifying environmental conditions that influence the presence and abundance of the models as the presence of organic compounds or heavy metals, linked to agricultural or industrial activities.

In the second chapter, heavy metal and antibiotic resistance phenotypes as well as presence of resistance genes were determined among *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* strains isolated from the sites studied in the previous chapter. These phenotypes were compared to those observed among strains isolated from the hospital in order to highlight environmental pressure favourable to the selection or maintenance of resistances as well as antibiotic and heavy metal resistance co-selection phenomenon.

In the third chapter, a global study on heavy metal and antibiotic resistance capacities of the indigenous microbial community of Pierrelaye, considered as the most heavy metal contaminated soil of our study, was realised. Isolates considered as representatives of the antibiotic and heavy metal resistant community have been identified. Presence of genes potentially implicated in these resistances and frequently found on genetic mobile elements was investigated by PCR in the identified representative isolates as well as in total soil DNA. Finally, a general conclusion on the work done during this thesis will enable to take stock on the progress achieved and prospects will be proposed.

PARTIE I : Revue Bibliographique
***Pseudomonas aeruginosa* et *Stenotrophomonas maltophilia* :**
complémentarité des deux modèles de bactéries
pathogènes opportunistes

I- Ecologie des modèles

Pseudomonas aeruginosa et *Stenotrophomonas maltophilia*, bactéries Gram négatif de la classe des γ -protéobactéries (Figure 9), sont considérées dans la littérature comme des bactéries versatiles et ubiquistes. Ces qualificatifs se justifient par leur large distribution dans des environnements variés, naturels, anthropisés ou créés par l'Homme et leur grande capacité d'adaptation à des environnements présentant des conditions extrêmes et variables. De plus, ces bactéries sont également capables d'interagir avec d'autres organismes et d'établir des relations de mutualisme, commensalisme ou parasitisme. Les études relatives à la distribution des modèles utilisent dans la grande majorité des cas la méthode cultivable. Les milieux de culture, pour la plupart mis au point dans le milieu clinique, reposent surtout sur les capacités métaboliques et de résistance intrinsèque aux antibiotiques des deux modèles (Goto & Enomoto, 1970, Kerr, *et al.*, 1996). Les milieux utilisés pour l'isolement de *P. aeruginosa* reposent également sur la capacité de cette bactérie à produire des pigments (Brown & Lowbury, 1965). Ceux généralement utilisés pour l'isolement de *S. maltophilia* reposent également sur certaines capacités métaboliques telles que celle de consommer le mannitol sans produire d'acide (Kerr, *et al.*, 1996).

I-1- Bactéries environnementales ubiquistes

Afin de mieux comprendre l'écologie de ces deux bactéries, nous allons nous intéresser dans ce premier paragraphe à leur distribution dans un large panel d'environnements. En effet, ces modèles sont fréquemment retrouvés dans des environnements terrestres et aquatiques naturels mais également dans des milieux pollués (métaux, hydrocarbures, pesticides...) du fait de certaines activités anthropiques. Cette présence dans des environnements impactés est souvent corrélée avec certaines capacités d'adaptation de ces bactéries, pouvant potentiellement être utilisées dans le cadre de bioremédiation, dépollution ou biotechnologie. Enfin, nous verrons que ces bactéries sont capables de survie et se multiplier dans l'environnement hospitalier, milieu créé par l'Homme, rendu hostile pour les bactéries du fait des fortes concentrations en antibiotiques et antiseptiques utilisées de façon courante.

I-1-a- Présence dans les milieux terrestres et aquatiques

- Distribution de *P. aeruginosa* dans les environnements naturels

P. aeruginosa est souvent considérée comme une bactérie associée aux environnements aquatiques ou humides et sa détection dans de tels environnements a fait l'objet de nombreuses études. En particulier, la prévalence de *P. aeruginosa* dans les eaux de rivière est connue depuis de nombreuses années. Une des plus anciennes études a été réalisée par Pellet et collaborateurs en 1983 sur des échantillons d'eau du fleuve Mississippi (Pellett, *et al.*, 1983). Environ 34 % (26/77) de ces échantillons étaient positifs pour la détection de *P. aeruginosa*, qui fut alors considérée comme population autochtone du fleuve. En plus de sa forte prévalence dans l'écosystème rivière, il a été montré qu'il existait une forte diversité au sein de la population indigène présente et que cette diversité reflétait la diversité globale de *P. aeruginosa*, toute origine confondue (environnementale et clinique) (Pirnay, *et al.*, 2005). Les eaux de rivières seraient un habitat préférentiel de *P. aeruginosa* et constitueraient donc un réservoir de souches potentiellement pathogènes.

La présence de *P. aeruginosa* dans l'eau de mer a également été investiguée et une forte prévalence est retrouvée dans les zones côtières (Yoshpe-Purer & Golderman, 1987). Sa présence dans les eaux océaniques a récemment été mise en évidence par Khan et collaborateurs (Khan, *et al.*, 2007). Cette étude a montré que la distribution de *P. aeruginosa* est plus sporadique dans ces eaux et les populations moins diverses, certainement du fait de la limitation des échanges avec d'autres environnements et le faible impact des activités anthropiques.

P. aeruginosa a également été mise en évidence dans des eaux récréatives telles que les lacs, les piscines, jacuzzis et spas (Esterman, *et al.*, 1984, Moore, *et al.*, 2002, Barben, *et al.*, 2005). Ces études sont particulièrement importantes d'un point de vue de santé publique du fait que cette présence a parfois pu être corrélée à des infections chez les baigneurs (Reid & Porter, 1981, van Asperen, *et al.*, 1995). La présence de *P. aeruginosa* dans l'eau de boisson (eau du robinet) (Liguori, *et al.*, 2010) et les eaux embouteillées a également été rapportée (Hunter, 1993).

En revanche, sa présence dans le sol en tant que bactérie indigène est plus controversée. Peu d'études ont mis en évidence la présence de *P. aeruginosa* dans les sols. De plus, ces études sont relativement anciennes. Une des plus anciennes est celle menée par Ringen et Drake en 1952, dans laquelle *P. aeruginosa* n'a pu être isolée que dans 3 des 100

sols testés, suggérant une faible prévalence de cette bactérie dans les sols. Les tentatives de ré-isolement à partir des mêmes sols se sont révélées infructueuses, mettant en question l'origine des souches isolées (apport exogène) et la capacité de survie de *P. aeruginosa* dans les sols. En 1974, Green et collaborateurs ont eu plus de succès dans l'isolement de *P. aeruginosa* (Green, *et al.*, 1974). En effet, cette bactérie a été détectée dans 14 des 58 sols agricoles californiens testés (soit 23 %). Les auteurs justifient ces résultats par une méthode d'isolement plus performante que celle utilisée par Ringen et Drake, notamment grâce à l'utilisation d'une étape d'enrichissement. Les auteurs de cette étude sont donc en faveur de l'hypothèse selon laquelle *P. aeruginosa* est un habitant indigène des sols. De plus, ils réfutent l'hypothèse d'une origine exogène des souches isolées, et argumentent ce point de vue par le fait que l'eau d'irrigation des sols testés est dépourvue de *P. aeruginosa* et que ces sols n'ont fait l'objet d'aucun traitement par des pesticides ou apport organique *via* les animaux. Toutefois, la survie de *P. aeruginosa* dans les sols a également été remise en question par l'étude de Zechman et Casida en 1982, dans laquelle l'inoculation de *P. aeruginosa* dans un sol non stérilisé conduit à une mortalité rapide de la bactérie

- Distribution de *S. maltophilia* dans les environnements naturels

Contrairement à *P. aeruginosa*, il est admis que *S. maltophilia* est très répandue dans les sols, qui constituent un des principaux réservoirs de cette bactérie (Ryan, *et al.*, 2009). D'abord nommée *Pseudomonas maltophilia*, puis *Xanthomonas maltophilia*, *S. maltophilia* est fréquemment isolée d'environnements terrestres, en particulier de la rhizosphère de différentes plantes (Berg, *et al.*, 1996). Toutefois, les études mettant en évidence la prévalence et la densité des populations indigènes du sol de *S. maltophilia* sont rares et ce n'est souvent pas l'objectif premier de ces études. Parmi ces études, on peut citer celle de Juhnke et Des Jardin ayant pour objectif le développement d'un milieu de culture (XMSM *Xanthophilia maltophilia* selective medium) permettant de détecter la présence de *S. maltophilia* dans les sols (Juhnke & des Jardin, 1989). Afin de valider ce milieu de culture, 30 sols bruts ou de rhizosphère ont été criblés (sols du Montana et de Floride : terrain de golf, pelouses résidentielles, pâturage, rhizosphère de céréales, orangeries, palme, canne à sucre). *S. maltophilia* a été détectée dans 27 des 30 sols testés avec des densités variant de 10^1 à 10^3 ufc (unité formant colonie)/g de sol, ce qui est en faveur de son endémicité dans les sols.

Peu d'études portent sur la distribution de *S. maltophilia* dans le milieu aquatique, toutefois, cette espèce a été isolée d'échantillons d'eau de mer (Matyar, *et al.*, 2008), d'eau de nappe (Glucksman, *et al.*, 2000), d'eau potable (Romano, *et al.*, 1997) et d'eau minérale non

gazeuse embouteillée (Wilkinson & Kerr, 1998). Une étude récente a permis d'isoler *S. maltophilia* dans des lacs de haute altitude, caractérisés par des conditions extrêmes telles qu'un haut niveau de radiations aux UV-B, une forte salinité, une faible présence de nutriments et des fluctuations de températures importantes, suggérant d'importantes capacités d'adaptation chez cette bactérie (Flores, *et al.*, 2009).

Les densités de population dans les environnements aquatiques sont souvent inconnues. Toutefois, une étude menée par Piccini et collaborateurs a montré que les populations de *S. maltophilia* pouvaient être majoritaires au sein des communautés planctoniques d'eau douce et saumâtre de la lagune côtière peu profonde de l'océan Atlantique sud (Piccini, *et al.*, 2006). Une succession saisonnière des populations majoritaires est observée, avec une communauté composée à plus de 90 % de *S. maltophilia* lorsque certains nutriments sont présents (en particulier la leucine).

Ainsi, *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* sont isolées à la fois d'environnements aquatiques et terrestres et peuvent partager les mêmes niches écologiques. Il semble toutefois que *P. aeruginosa* présente plus de facilité à survivre dans les milieux aquatiques et que sa présence dans le sol soit plus sporadique. Au contraire, *S. maltophilia* peut être considérée comme une bactérie indigène du sol mais elle est également assez fréquemment retrouvée dans des milieux aquatiques. Même si la présence de cette bactérie a été décrite à plusieurs reprises, sa mise en évidence dans les environnements naturels fait l'objet de peu d'études. Des études supplémentaires seraient nécessaires à l'évaluation de la distribution de cette bactérie dans de tels environnements. Les études présentées dans ce paragraphe permettent de mieux appréhender la prévalence des modèles dans les environnements naturels. Toutefois, peu d'informations sont à ce jour disponible en ce qui concerne leur abondance et les facteurs impliqués dans leur répartition.

I-1-b- Présence dans les milieux pollués et capacité de bioremédiation

- Les eaux usées

Les eaux usées peuvent être considérées comme des eaux impactées par les activités humaines domestiques (rejets des excréments, eaux de nettoyage...), industrielles (composés chimiques, biologiques, métaux ...) ou agricoles (rejet de pesticides, engrais, fèces

d'animaux...). Ces eaux contiennent potentiellement une communauté microbienne riche (Lee, *et al.*, 2006) et la recherche de la présence de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* dans ces eaux à fait l'objet de nombreuses études. Il a également été rapporté à plusieurs reprises que ces bactéries étaient capables de survivre aux différentes étapes de désinfection visant à l'élimination des microorganismes lors du processus de traitement de ces eaux (Hoefel, *et al.*, 2005). Notamment, l'étude de Schwartz et collaborateurs a mis en évidence la présence de *P. aeruginosa* dans des eaux usées du milieu clinique, des eaux usées municipales, dans l'eau à l'issue du processus de traitement et même dans l'eau de la rivière en aval, ceci dans différentes villes d'Allemagne (Schwartz, *et al.*, 2006). La plus forte densité de population a été obtenue dans les eaux usées cliniques et des souches résistantes à la ciprofloxacine (antibiotique de la famille des quinolones, utilisé dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*) ont été isolées des eaux usées cliniques et municipales ainsi que dans les eaux des rivières en aval. Cette étude suggère que la dissémination de certaines résistances aux antibiotiques dans le milieu aquatique serait liée à leur utilisation en thérapie. En plus des résistances aux antibiotiques, les souches isolées des eaux usées présentent fréquemment des résistances à d'autres composés. Notamment, l'étude de Filali et collaborateurs a mis en évidence la présence d'une souche de *P. aeruginosa* dans les eaux usées de la ville de Casablanca (Maroc) présentant d'importantes capacités de résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et à des hydrocarbures aromatiques comme le naphthalène et l'anthracène (Filali, *et al.*, 2000).

- Les environnements contaminés en métaux lourds

Les métaux lourds, récemment requalifiés d'éléments trace métalliques, sont présents naturellement dans l'environnement à l'état de trace et leur concentration peut être augmentée par différentes activités humaines (industrielles, agricoles, minières...). Certains de ces éléments comme le zinc, le cuivre ou le fer sont indispensables à la vie à de faible dose et deviennent toxiques à forte concentration. D'autres présentent une forte toxicité même à faible dose, c'est le cas notamment du mercure ou du cadmium. *S. maltophilia* et *P. aeruginosa* ont également été fréquemment isolés d'environnements contaminés en métaux lourds que ce soit de milieux aquatiques (Matyar, *et al.*, 2008, Matyar, *et al.*, 2009), de sédiments ou de sols (Marques, *et al.*, 1979). La présence de ces deux bactéries a même été rapportée dans la même zone contaminée. En effet, deux études menées dans la baie d'Iskenderun (côte sud de la Turquie), zone fortement contaminée en métaux, surtout fer et plomb, du fait des nombreuses industries qui l'entourent, ont mis en évidence la présence de

ces deux modèles. En particuliers, *S. maltophilia* a été isolée de différents échantillons d'eau de mer, de sédiments et de crevettes (Matyar *et al.*, 2008). Ces études montrent également que les souches isolées présentent une forte tendance à la multi-résistance à différents composés (métaux lourds et antibiotiques). Ces souches, présentant une importante capacité à résister à des fortes concentrations en différents métaux, sont des candidats potentiels pour la remédiation de sites contaminés.

Récemment, différentes souches de *S. maltophilia*, isolées d'environnements contaminés, ont fait l'objet d'une attention particulière du fait de leurs propriétés intéressantes d'un point de vue industriel. C'est le cas par exemple de la souche AuRed02 isolée d'une mine d'or (Nangia, *et al.*, 2009). Cette souche est capable de synthétiser des nanoparticules d'or, utilisables notamment en optique ou en thérapie, en présence d'une solution de chlorure d'or (HAuCl_4) dans le milieu de culture. Une étude menée par Dungan et collaborateurs a également mis en évidence la présence d'une souche de *S. maltophilia* dans des sédiments contaminés en sélénium, capable d'utiliser le sélénate (SeO_4^{2-}), le sélénite (SeO_3^{2-}), le sulfate (SO_4^{2-}) et le nitrate (NO_3) comme accepteur terminal d'électrons (Dungan, *et al.*, 2003). En 48 heures, cette souche retire 99,8 % du SeO_4^{2-} et SeO_3^{2-} présent dans le milieu et le transforme en Se^0 élémentaire, moins toxique. L'utilisation de ce procédé ouvre de nouvelles perspectives dans la dépollution des sites contaminés, qui reste à ce jour très coûteuse.

- Les environnements contaminés en hydrocarbures

La contamination des écosystèmes naturels par les hydrocarbures est un problème environnemental majeur. La dégradation de ces molécules organiques par les microorganismes dans un but de dépollution est une piste largement investiguée ces dernières années. Ainsi, différentes études mettent en évidence dans les milieux contaminés la présence de consortiums bactériens capables de survivre et dégrader une ou plusieurs molécules. Parmi les espèces bactériennes composant ces consortiums, *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* sont fréquemment retrouvées, parfois même simultanément (Hawle-Ambrosch, *et al.*, 2007) et de nombreuses études ont rapporté leur capacité à dégrader un grand nombre de molécules, notamment parmi les hydrocarbures polycycliques (phénanthrène, fluoranthène, chrysène, benzanthracène, benzo[a]pyrène, naphtalène, benzène, toluène, xylène...) (Civilini, *et al.*, 1999, Cavalca, *et al.*, 2000, Kim, *et al.*, 2009). Certains des mécanismes liés à la résistance et/ou à la dégradation de ces molécules ont été identifiés et sont souvent associés à l'acquisition de gènes ou d'opérons particuliers (Civilini, *et al.*, 1999, Cavalca, *et al.*, 2000, Duarte, *et al.*, 2001).

Ces deux bactéries ont été mises en évidence à la fois dans des environnements aquatiques (Bhattacharya, *et al.*, 2000, Luo, *et al.*, 2009) et dans des sols contaminés (Cavalca, *et al.*, 2000, Duarte, *et al.*, 2001). Ainsi, alors que la présence de *P. aeruginosa* dans les sols naturels paraît sporadique, il semble que sa prévalence dans les sols impactés en hydrocarbures soit élevée. Notamment, Kaszab et collaborateurs ont recherché sa présence dans des eaux de nappes et des sols de 26 sites contaminés. Cette bactérie a été isolée dans 61,5 % des sites, plus précisément dans 57 % de ceux où des échantillons de sol ont été étudiés (Kaszab, *et al.*, 2009). Ainsi, ces bactéries peuvent être considérées comme un élément majeur des communautés présentes dans les environnements contaminés au niveau de leur prévalence. De plus, des études ont également montré qu'elles étaient impliquées majoritairement dans la dégradation des molécules. L'étude de Kim et collaborateurs montre que lorsque les espèces du consortium sont mises individuellement en présence de phénanthrène, leur activité de dégradation est faible. Par contre, lorsque différentes associations sont testées, on remarque que les plus performantes sont celles constituées avec *S. maltophilia* et *Acinetobacter baumannii*. Mais dans tous les cas, *S. maltophilia* reste l'espèce la plus abondante pendant le processus de dégradation (Kim, *et al.*, 2009).

Il a également été observé que certaines bactéries présentes dans le consortium n'agissent pas en participant à la dégradation des molécules mais peuvent la favoriser. Par exemple, il a été mis en évidence que *P. aeruginosa* peut être considéré comme un assistant « helper » en favorisant l'accès aux molécules par les autres bactéries composant le consortium par la production de rhamnolipides agissant comme biosurfactants (Deziel, *et al.*, 1996, Garcia-Junco, *et al.*, 2001).

- Les environnements présentant d'autres types de contaminations

La présence de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* a également été rapportée dans des environnements contaminés en biocides tels que les pesticides ou fongicides. Les souches mises en évidence présentent une fois de plus des capacités de dégradation de molécules intéressantes en bioremédiation. Notamment, l'étude de Juhasz et collaborateur a permis d'isoler une souche de *S. maltophilia* dans un sol contaminé en pentachlorophénol (fongicide) capable de survivre en présence d'hydrocarbures polycycliques, de composés aromatiques chlorés et nitrés et du pesticide DDT (Juhasz, *et al.*, 2000).

De même, cinq souches de *P. aeruginosa*, isolées à partir d'échantillons de mer de la côte Ouest de l'Inde contaminée en organotine présentent des résistances à des composés dérivés de l'organotine mais également à différents métaux et antibiotiques. Les mécanismes à

l'origine de ces résistances restent indéterminés, toutefois l'acquisition des résistances aux composés dérivés de l'organotine et aux métaux pourraient avoir été acquis simultanément du fait que les peintures antifouling utilisées pour empêcher le développement de biofilm sur les bateaux sont très souvent composées de ces molécules et de métaux tels que le zinc (Roy & Nair, 2007).

Ainsi, les modèles bactériens *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* sont fréquemment retrouvés dans des environnements pollués du fait de différentes activités anthropiques, ce qui suggère une grande adaptabilité. De plus, la capacité de survie en présence des contaminations présentes est souvent associée à une capacité de résistance à un spectre plus large de molécules. Toutefois, on remarque que les études mettant en évidence leur présence dans de tels environnements sont soit descriptives, soit s'intéressent à mettre en évidence des capacités de traitement des déchets, de biodégradation de certains composés dans un but de bioremédiation. Une fois de plus, peu de données sont disponibles sur la prévalence de ces deux bactéries et sur les facteurs qui influencent leur distribution, en terme de présence et d'abondance.

I-1-c- Présence dans les environnements hospitaliers

La présence de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* dans l'environnement hospitalier a fréquemment été décrite (Tableau 1). Contrairement aux études menées dans les environnements naturels ou pollués, les études menées dans le milieu clinique sont plus précises en ce qui concerne la distribution, la prévalence et la diversité des deux modèles, certainement du fait de leur implication en santé publique.

Le milieu aquatique étant une niche privilégiée de *P. aeruginosa*, une attention particulière est portée à la recherche de cette espèce au sein du réseau d'eau hospitalier (robinets, douches...) (Trautmann, *et al.*, 2005). En ce qui concerne *S. maltophilia*, des études ont également montré qu'elle était préférentiellement isolée d'environnements humides et que sa capacité de survie sur les surfaces sèches du milieu clinique telles que le sol ou les surfaces vitrées était faible voire nulle (Denton & Kerr, 1998). Les environnements aquatiques ou humides semblent donc être les sites les plus susceptibles d'abriter ces bactéries.

Tableau 1. Source de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* dans l'environnement hospitalier (non exhaustif). D'après Denton & Kerr, 1998 ; Senol, 2004 et Kerr & Snelling, 2009.

Sources potentielles de <i>S. maltophilia</i>	Sources potentielles de <i>P. aeruginosa</i>
Solutions de désinfectant	Solution de désinfectant, antiseptiques
Douche, lavabo, robinet	Douche, lavabo, robinet
Machine à dialyse	Équipement de respiration artificielle
Nébuliseur	Eau du bain, jouet pour le bain
Thermomètre	Savon
Mains du personnel soignant	Brosse à dents
Fluides intraveineux	Fleurs
Moniteur de pression artérielle	Endoscope
Pompe intra-aortique	Uromètre
Cathéter	Circuit de ventilation
Piscines d'hydrothérapie	Piscines d'hydrothérapie
Machine à glace	Machine à glace

Certaines de leurs capacités vont favoriser leur maintien dans ces niches. Parmi ces aptitudes, on peut notamment citer leurs capacités de résistance à différents antiseptiques, biocides et antibiotiques. Ces capacités sont soit innées soit elles ont été sélectionnées dans le milieu hospitalier où la pression de sélection est forte. Une autre propriété favorisant le maintien de ces bactéries dans ces environnements hostiles est leur capacité à former des biofilms sur des surfaces inertes, ce qui renforce leur capacité de résistance aux désinfectants et empêche également l'enlèvement physique (Liaw, *et al.*, Kerr & Snelling, 2009).

Toutefois, établir le fait que les environnements hospitaliers sont des réservoirs potentiels de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* ne suffit pas à montrer que ces bactéries constituent un risque d'infection pour les personnes hospitalisées. De ce fait, un certain nombre d'études a eu pour objectif de mieux appréhender la diversité de ces bactéries dans le milieu clinique, leur capacité de survie à long terme et leur implication dans les infections nosocomiales épidémiques (Doring, *et al.*, 1993, Reuter, *et al.*, 2002, Cholley, *et al.*, 2008). Notamment, une étude récente réalisée au sein de notre équipe de recherche a eu pour objectif d'étudier la diversité intra-spécifique de *P. aeruginosa* dans le réseau d'eau du service de soins intensifs de l'hôpital Henri Gabrielle (Lyon) sur une période de deux ans (Lavenir, *et al.*, 2008). Cette étude a mis en évidence une forte prévalence de cette bactérie puisque elle a été isolée dans 68 % des échantillons d'eau du robinet testés. Vingt deux complexes clonaux ont été identifiés tout au long de l'étude, suggérant une importante diversité et une grande capacité à coloniser le réseau d'eau. Parmi ces complexes clonaux, seulement certains ont été retrouvés tout au

long de l'étude, ce qui laisse à penser que les pressions fortes présentes dans cet environnement entraînent l'émergence de certains clones mieux adaptés. La responsabilité d'un de ces clones dans une infection nosocomiale a d'ailleurs été mise en évidence.

Une étude de Denton et collaborateurs a également montré une grande diversité des souches de *S. maltophilia* isolées de patients atteints de mucoviscidose ainsi que des environnements cliniques et fréquentés par ces patients (Denton, *et al.*, 1998). Cette étude suggère notamment que l'origine des infections de ces patients seraient plus probablement environnementale (maison ou hôpital) que liée à la transmission entre patients.

Ainsi, l'environnement hospitalier, en particulier les niches humides, semble constituer l'un des réservoirs de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. De plus, des études ont mis en évidence la responsabilité de certaines souches dans des infections nosocomiales. Toutefois, malgré les stratégies mises en œuvre pour les éradiquer, leur abondance et leur diversité restent importantes.

I-2- Interactions avec d'autres organismes

En plus d'une grande capacité d'adaptation à un large panel d'environnements, *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* vont être capables d'interagir avec les végétaux, les animaux et l'Homme. Ces interactions pourront être de différentes natures, mutualistes, parasitiques ou commensales en fonction des bénéfices et/ou des dommages ressentis par les deux partenaires.

I-2-a- Interactions avec les plantes

P. aeruginosa, est capable d'établir différents types d'association avec les plantes. D'une part, certaines souches de *P. aeruginosa* vont être capables d'avoir un effet bénéfique sur la plante hôte. Ainsi, différentes souches isolées de la rhizosphère ont montré des capacités à promouvoir la croissance des plantes. Cette capacité est liée à des caractéristiques particulières, souvent souche spécifique. La capacité à produire des antifongiques a par exemple été mise en évidence chez certaines souches, à la fois environnementales et cliniques (Mavrodi, *et al.*, 2001). La production de l'hormone de croissance acide indole 3-

acétique (AIA), de sidérophores et de phosphatases permettant d'améliorer la disponibilité en fer et en phosphore, respectivement, ont également été mises en évidence chez différentes souches et sont souvent corrélées avec l'induction de la croissance des plantes. La souche PUPa3 en particulier a retenu notre attention (Kumar, *et al.*, 2005). Cette souche est capable de produire un antifongique à large spectre : le phenazine-1-carboxamide (PCN), agissant notamment contre des champignons responsables d'infection chez des plantes d'intérêt économique majeur telles que le riz, la canne à sucre, le thé, le coton ou le tabac. Ce fongicide est 10 fois plus actif que le HCN (acide cyanhydrique), produit par d'autres souches de *P. aeruginosa* promotrices de croissance. En plus de la synthèse de cette molécule, PUPa3 produit également de l'AIA, des sidérophores et des phosphatases, ce qui fait de cette souche un excellent candidat pour l'amélioration du rendement des cultures. Toutefois, il a été montré que malgré des capacités à promouvoir la croissance des plantes par certaines souches de *P. aeruginosa* en laboratoire, aucun effet bénéfique n'était observable aux champs. Cette observation serait due à l'incapacité de certaines souches à survivre ou rester active dans les sols. Devliegher et collaborateurs suggèrent que l'ajout d'une source de carbone dans les sols pourrait diminuer la compétition bactérienne, entraînant un effet positif de *P. aeruginosa* sur la croissance des plantes (Devliegher, *et al.*, 1995). La capacité à survivre en présence de pesticides et de les dégrader semble également être une caractéristique intéressante de certaines souches de *P. aeruginosa* entraînant un effet sur la plante (Chapalmadugu & Chaudhry, 1993). C'est le cas par exemple de la souche PS1 (Ahemad & Khan, 2010). Cette souche, isolée de la rhizosphère de la moutarde, est capable d'induire la croissance du haricot vert, en particulier en présence d'herbicide. Cette augmentation s'explique d'une part par la production de substances qui stimulent la croissance de la plante telles que l'AIA, mais également par la réduction de la disponibilité de l'herbicide due à la sécrétion d'exopolysaccharides par la souche dans les sols.

D'autre part, différentes souches de *P. aeruginosa* ont montré des capacités à créer des dommages chez les plantes (Rahme, *et al.*, 1995). La plupart de ces études ont été réalisées en laboratoire en testant l'effet de souches isolées principalement du milieu clinique sur différentes plantes (Elrod & Braun, 1942). Ces études ont notamment pour vocation la mise en évidence des facteurs de virulence qui pourront être utilisés de la même façon chez les hôtes animaux et végétaux (Starkey & Rahme, 2009). Parmi les souches les plus virulentes, la souche PA14 a fait l'objet d'études approfondies. Son effet sur la plante *Arabidopsis thaliana* a été investigué en détail. Il a été montré qu'elle était capable d'envahir la plante au niveau

des feuilles par les blessures et les stomates et de causer des infections locales ou systémiques entraînant la mort de la plante au bout de quelques jours (Plotnikova, *et al.*, 2000). Il a également été montré que PA14 était capable d'infecter les racines d'*Arabidopsis* et du basilic *in vitro* et dans le sol. Cette infection entraîne une réponse immunitaire de la plante qui produit alors des molécules antibactériennes telles que l'acide rosmarinique. Ces molécules ne permettent toutefois pas l'élimination de *P. aeruginosa* organisée en biofilm (Walker, *et al.*, 2004). Enfin, le séquençage de cette souche a permis de mettre en évidence la présence de deux îlots de pathogénicité impliqués dans la réussite de l'infection à la fois chez les animaux et les plantes (He, *et al.*, 2004).

Enfin, *P. aeruginosa* est également fréquemment trouvé sur certains fruits et plantes vertes sans causer de dommages (Cho, *et al.*, 1974). Cette mise en évidence est particulièrement intéressante d'un point de vue de santé publique puisque sa présence sur des plantes ornementales pourrait constituer une source de contamination pour les personnes hospitalisées.

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de *S. maltophilia* dans la rhizosphère de différentes plantes (Juhnke & des Jardin, 1989, Berg, *et al.*, 1996), toutefois, elle peut également être isolée de la surface ainsi que des tissus internes de la plante en particulier dans les tissus vasculaires des racines et de la tige (Garbeva, *et al.*, 2001, Ryan, *et al.*, 2009). Dans tous les cas, les interactions établies entre *S. maltophilia* et les plantes sont toujours à bénéfices réciproques et aucune espèce du genre *Stenotrophomonas* n'est connue pour être phytopathogène. Les associations entre *S. maltophilia* et les plantes ont fait l'objet de nombreuses études étant donné les capacités d'induction de la croissance des plantes par les espèces du genre *Stenotrophomonas* (Berg, 2009). Cet effet présente un intérêt particulièrement important en biotechnologie. Notamment, l'utilisation de ces bactéries permettrait de diminuer l'utilisation de produits chimiques pour l'amélioration des rendements agricoles.

Différents facteurs seraient impliqués dans la réussite de l'association *S. maltophilia*-plante hôte. Notamment, la colonisation de la plante serait favorisée par la mobilité et les capacités d'adhésion de *S. maltophilia*. Ces propriétés sont dues à la présence de fimbriae et de pili, impliqués à la fois dans l'adhésion et la formation de biofilms (de Oliveira-Garcia, *et al.*, 2003), contribuant certainement à la rendre plus compétitive vis-à-vis des autres bactéries présentes dans la rhizosphère. Il a également été montré qu'une espèce de *S. maltophilia*

épiphyte pouvait altérer les tissus de la plante pour favoriser les échanges. En effet, la souche SaO5sm est capable d'augmenter la perméabilité de la feuille de la plante hôte, ce qui a pour conséquence d'augmenter la disponibilité en eau et en composés dissouts à la fois pour la plante et pour la bactérie (Schreiber, *et al.*, 2005). Toutefois, le mécanisme à l'origine de ces modifications est à ce jour inconnu.

La stimulation de la croissance des plantes ne serait pas une particularité réservée aux souches environnementales. En effet, l'étude de Suckstorff et Berg a montré que différentes souches de *S. maltophilia* étaient capables de stimuler la croissance des racines et des poils racinaires de plantes quelles soient d'origine environnementale ou clinique (Suckstorff & Berg, 2003). L'effet semble toutefois inférieur chez les souches d'origine clinique mais reste significatif. Cette étude montre également que l'effet observé serait dose-dépendant et impliquerait la synthèse par la bactérie de l'hormone de croissance AIA.

De plus, *S. maltophilia* semble avoir différentes propriétés lui permettant d'agir comme agent de bio-contrôle sur les compétiteurs ou pathogènes de plantes présents dans la rhizosphère. Elle est notamment capable de produire différentes molécules qui vont avoir un rôle fongicide ou bactéricide (Juhnke, *et al.*, 1987). En particulier, la souche R3089 est capable de synthétiser un fongicide nommé maltophiline (Jakobi, *et al.*, 1996). Il a été montré que cette molécule était capable d'inhiber la croissance de différents champignons saprophytes mais également pathogènes des plantes et de l'Homme, par contre aucune activité contre les bactéries n'a été observée. *S. maltophilia* présente également des propriétés hydrolytiques importantes et produit différentes protéases. Certaines d'entre elles, notamment les chitinases peuvent intervenir dans le contrôle des champignons pathogènes de plantes en lysant leur paroi cellulaire (Zhang, *et al.*, 2001). *S. maltophilia* serait même une des espèces dominantes dans la dégradation de chitine au sein de la communauté microbienne du sol (Krsek & Wellington, 2001).

La compétition pour le fer semble un facteur important pour la survie et la croissance des bactéries dans la rhizosphère (Jurkevitch, *et al.*, 1992). La présence dans les génomes séquencés de *S. maltophilia* de plusieurs gènes impliqués dans la formation de sidérophores augmenterait les capacités de compétition de cette bactérie et favoriserait sa survie dans la rhizosphère (Ryan, *et al.*, 2009).

Les capacités à promouvoir la croissance des plantes de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* font l'objet de nombreuses études. Toutefois, leur utilisation aux champs peut poser un problème d'éthique. Il est important de ne pas perdre de vue que ces modèles bactériens sont également des pathogènes opportunistes majeurs, d'une grande importance d'un point de vue de santé publique. Leur utilisation en agriculture ou dans d'autres domaines de biotechnologie doivent être parfaitement contrôlée et maîtrisée. De plus, d'autres espèces appartenant aux genres *Stenotrophomonas* (en particulier *S. rhizophila*) et *Pseudomonas* (autres *Pseudomonas* fluorescents) offrent également de bonnes perspectives tout en s'affranchissant du problème lié au caractère pathogène de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*, notamment dans la promotion de croissance des plantes.

I-2-b- Interactions avec les animaux

S. maltophilia et *P. aeruginosa* ont également été mises en évidence chez différents animaux, notamment chez des animaux domestiques et d'élevage. Chez ces animaux, ces bactéries vont soit appartenir à la flore commensale de façon transitoire soit elles vont être responsables de pathologies (Mushin & Ziv, 1973). Dans tous les cas, les animaux porteurs constituent un réservoir potentiel de ces bactéries qui pourraient potentiellement être à l'origine de transmission aux personnes fragilisées lors de contacts. D'autre part, l'implication de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* dans des épidémies au sein d'animaux d'élevage peut entraîner des pertes économiques. Les pathologies liées à ces bactéries sont variées, elles vont notamment être responsables d'otites, de conjonctivites, de kératites ou encore d'infections pulmonaires (Hammer, *et al.*, 2003, Johnson, *et al.*, 2003, Ledbetter, *et al.*, 2009).

A ce jour, peu d'études rapportent la responsabilité des deux modèles dans des épidémies au sein de troupeaux d'élevage. Ainsi, l'implication de ces bactéries en santé animale semble limitée. Toutefois, les pathologies associées sont graves et les traitements sont souvent lourds et inefficaces. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de *P. aeruginosa* dans des mammites chez des troupeaux de vaches, chèvres et brebis (Leitner & Krifucks, 2007). Différentes origines possibles ont été identifiées notamment la contamination d'une solution contenant un antibiotique utilisé pour le traitement des vaches (Osborne, *et al.*, 1981). D'autres hypothèses ont également été avancées telles que la contamination par des souches environnementales présentes notamment dans l'eau de boisson des animaux ou les contaminations entre animaux du fait d'un haut taux de portage fécal (Mushin & Ziv, 1973).

Des épidémies de pneumonies hémorragiques ont également été mises en évidence dans des troupeaux de visons et *P. aeruginosa* semble particulièrement virulente chez ces mammifères (Hammer, *et al.*, 2003). Toutefois, les raisons de cette virulence ainsi que l'origine des infections sont inconnues. *S. maltophilia* est plutôt considérée comme un colonisateur secondaire lors d'une infection animale, profitant des faiblesses de l'hôte pour se développer. Toutefois, une étude menée par Johnson et collaborateur suggère que cette bactérie pourrait être responsable de lymphadénites chez plusieurs chèvres d'un même troupeau du fait qu'elle ait été la seule isolée des abcès présents chez ces chèvres (Johnson, *et al.*, 2003).

En revanche, de nombreuses études mettent en évidence la présence de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* chez des animaux fréquemment en contact avec l'Homme. Elles ont notamment été isolées d'animaux domestiques tels que les chiens, les chats ou les chevaux (Hariharan, *et al.*, 2006, Albin, *et al.*, 2009, Winther, *et al.*, 2009), mais également de nouveaux animaux domestiques (NAC) tels que les tortues (Diaz, *et al.*, 2006), les serpents (Colinon, *et al.*, 2009, Hejnar, *et al.*, 2010) ou les chinchillas (Wideman, 2006). Elles sont également impliquées dans des infections chez des animaux de zoo, en particulier les reptiles (serpents, crocodiles) (Harris & Rogers, 2001, Miller, *et al.*, 2004, Colinon, *et al.*, 2009) ou d'oiseaux marins recueillis dans des centres de soins animaliers (Steele, *et al.*, 2005). Ces études permettent de mettre en évidence des réservoirs potentiels de ces bactéries qui pourraient être transmises à des personnes fragilisées. En particulier, la présence de souches particulièrement résistantes aux antibiotiques constitue un risque supplémentaire pour les personnes fragilisées en contact avec les animaux infectés ou porteurs. L'acquisition de ces résistances peut être attribuée à certaines pratiques de l'Homme. Notamment, la présence de résistance aux aminoglycosides chez des souches isolées de tortues domestiques serait liée à l'utilisation de sulfate de gentamycine pour éradiquer les Salmonelles fréquemment présentes chez ces animaux (Diaz, *et al.*, 2006).

Il est aussi intéressant de noter que *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* peuvent être présentes chez des vecteurs potentiels tels que la tique *Ixodes ricinus*, vecteur notamment de *Borrelia burgdorferi* (à l'origine de la maladie de Lyme) (Stojek & Dutkiewicz, 2004). Toutefois, aucune preuve de transmission de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* par vecteur n'est à ce jour rapportée dans la littérature.

I-2-c- Interactions avec l'Homme

- Portage

P. aeruginosa et *S. maltophilia* peuvent être présentes chez l'Homme sans engendrer de pathologie. Même si ces bactéries ne sont pas reconnues comme indigènes de la microflore de l'Homme, elles peuvent être retrouvées dans le tube digestif ou dans l'oropharynx. Leur prévalence semble toutefois plus importante chez les personnes hospitalisées que chez les personnes en bonne santé (Thuong, *et al.*, 2003). En effet, l'étude de Kerr et collaborateurs, menée à la fois sur des patients et sur des personnes en bonne santé montrent la présence de *S. maltophilia* dans les fèces de 33 % des patients et seulement 2,9 % des personnes saines (Kerr, *et al.*, 1991). De même, une étude de Stoodley et Thom a montré que *P. aeruginosa* était présente dans les fèces de 36 % de patients, ce chiffre augmente à 52,6 % chez les patients qui ont subi une intervention chirurgicale gastro-intestinale (Stoodley & Thom, 1970). En revanche, cette bactérie n'a été isolée que dans 4 % des fèces de personnes en bonne santé. Leur présence au niveau des voies respiratoires a fait l'objet d'un plus grand nombre d'études en particulier chez les patients hospitalisés nécessitant l'utilisation d'appareils respiratoires. Il semblerait notamment que la présence de *P. aeruginosa* dans la flore du patient à son entrée à l'hôpital favoriserait la colonisation et le développement d'infection suite à une trachéotomie (Morar, *et al.*, 2002). D'autre part, l'utilisation d'antibiotiques inefficaces sur *P. aeruginosa* pourrait participer à la sélection de souches résistantes causant ces infections respiratoires (Thuong, *et al.*, 2003). En revanche, peu d'études mettent en évidence la présence de *S. maltophilia* dans les voies respiratoires sans lien avec une pathologie. Toutefois, bien que fréquemment présente chez des personnes malades, il est parfois difficile d'établir de façon définitive la responsabilité de *S. maltophilia* dans les infections (Denton & Kerr, 1998).

La présence de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* a également été rapportée à de nombreuses reprises sur les mains et peut être à l'origine d'une transmission manu-portée (Adams & Marrie, 1982). En effet, le portage de ces bactéries par les mains du personnel soignant des hôpitaux peut constituer une source d'infection potentielle (Villarino, *et al.*, 1992, Lasheras, *et al.*, 2006). L'hygiène des mains et le port de gants sont ainsi indispensables afin d'éviter la transmission.

- Infections causées par *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*

P. aeruginosa et *S. maltophilia* sont capables de causer différentes pathologies chez l'Homme (Tableau 2). Toutefois, la majorité des infections causées par ces pathogènes est recensée au sein des personnes présentant une défaillance de leur système immunitaire, personnes hospitalisées, immunodéprimées (greffe, VIH...), personnes atteintes de cancer ou diabétiques... Elles infectent rarement les tissus sains et envahissent aisément les tissus où les défenses sont compromises et sont de ce fait fréquemment responsables d'infections nosocomiales. Ces bactéries sont considérées comme invasives et toxigènes du fait de la présence de facteurs de virulence qui vont leur permettre de s'attacher, coloniser et envahir les tissus ainsi que de sécréter des composés toxiques. Ces facteurs de virulence seront détaillés dans le paragraphe III-1-a.

En ce qui concerne *P. aeruginosa*, les mortalités les plus élevées sont observées en cas de bactériémie (30-50 %) et en cas de pneumonie nosocomiale (45-70 %) (Mesaros, *et al.*, 2007). Les bactériémies les plus fréquentes sont observées chez les patients neutropéniques (diminution des leucocytes), les patients en état d'immunodéficience en relation avec une infection par le virus HIV, chez les diabétiques ou chez les brûlés. Cette bactérie est un colonisateur fréquent des voies respiratoires et causent des infections chez les patients souffrant de bronchectasies et de broncho-pneumopathie obstructive, les patients soumis à une chimiothérapie anticancéreuse et présentant une neutropénie, chez les patients nécessitant le placement en soins intensifs ou chez les patients sous assistance respiratoire (ventilation assistée). Elle est également fréquemment retrouvée chez les personnes atteintes de mucoviscidose (cf. paragraphe suivant). De plus, *P. aeruginosa* est de plus en plus impliquée dans les pneumonies communautaires, c'est-à-dire acquises en dehors de l'hôpital. Toutefois, ces infections communautaires touchent préférentiellement des personnes fragilisées, immunodéprimées ou présentant des troubles respiratoires (Garau & Gomez, 2003).

P. aeruginosa est la troisième cause d'infections urinaires acquises à l'hôpital (12 %), le plus souvent consécutives à des cathérisations, des instrumentations ou une chirurgie (Obritsch, *et al.*, 2005). Ce pathogène opportuniste cause rarement de vraies infections du système digestif. Toutefois, des infections péri-rectales, des gastro-entérites typiques, et des entérocolites nécrosantes ont été rapportées. Les infections cutanées et osseuses sont rares mais peuvent survenir suite à des blessures pénétrantes.

Tableau 2. Infections causées par *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. D'après Mésaros *et al.*, 2007 ; Denton et Kerr, 1998.

Site d'infection	Pathologie spécifique	Fréquence
Tractus respiratoire	Pneumonie aigue	Fréquent
	Infections chroniques	
Sang	Bactériémie	Fréquent
	Septicémie	
Tractus urinaire	Infections aigues	Relativement fréquent
	Infections chroniques	
Oreille	Otite externe	Fréquent
	Otite moyenne chronique	
Peau et tissu mou	Dermatite	Relativement fréquent
	Infection de plaies	
	Infections de brûlure	
	Pyodermite	
	Folliculite	
	acne vulgaris résistant	
Œil	Kératite	Rare
	Enophtalmie	
	Ophthalmie néonatale	
	Conjonctivite	
Système nerveux central	Méningite	Rare
	Abcès cérébral	
Cœur	Endocardite	Rare
Os et articulations	Pyoarthrose sténoarticulaire	Rare
	Ostéomyélite vertébrale	
	Infection de la symphise pubienne	
	Ostéochondrite du pied	
	Ostéomyélite	
Tractus gastro-intestinal	Entérocolite nécrosante	Rare
	Infections périrectales	
	Péritonite	

P. aeruginosa peut causer des infections ophtalmiques dévastatrices telles que des kératites bactériennes chez les porteurs de lentilles de contact par exemple (Mesaros, *et al.*, 2007). Cette bactérie est également l'agent causal prédominant dans les otites malignes des patients diabétiques et les «otites du nageur» (une forme particulière d'otite externe) (van Asperen, *et al.*, 1995).

Des méningites et des abcès cérébraux se propageant depuis des structures voisines ou consécutifs à des traumatismes ou des procédures diagnostiques invasives, ainsi que des endocardites notamment chez les utilisateurs de drogues intraveineuses ont également été rapportés (Veber, 2003).

En ce qui concerne *S. maltophilia*, les bactériémies sont également fréquentes et semblent en augmentation ces dernières années. Le taux de mortalité lié à ces bactériémies peut être élevé (environ 25 %) (Senol, *et al.*, 2002). Elles peuvent être contractées à la suite d'infections pulmonaires, urinaires ou gastro-intestinales mais de plus en plus d'études mettent en cause l'utilisation d'intraveineuse comme source primaire de l'infection (Muder, *et al.*, 1996). *S. maltophilia* est responsable de 5 % des pneumonies nosocomiales et les voies respiratoires constituent le site le plus commun d'isolement de cette bactérie (plus de 50 % des isolats cliniques de *S. maltophilia*) (Denton & Kerr, 1998, Schaumann, *et al.*, 2001). Ces infections sont favorisées par l'utilisation de matériel d'assistance respiratoire, par la pratique de trachéotomies, par l'exposition à des antibiotiques à large spectre et sont associées à un fort taux de mortalité avec ou sans traitement anti-*S. maltophilia* (Pathmanathan & Waterer, 2005).

La responsabilité de *S. maltophilia* dans des endocardites a été mentionnée à de nombreuses reprises. Dans la plupart des cas, ces endocardites sont survenues chez des utilisateurs de drogues en intraveineuse ou à la suite d'une chirurgie cardiaque. Les méningites causées par *S. maltophilia* sont rares et sont toujours liées à une neurochirurgie ou à la présence de matériel clinique étranger. Elle est également rarement responsable d'infections gastro-intestinales. De même, les infections urinaires dues à *S. maltophilia* sont rares et sont généralement contractées à la suite d'une intervention chirurgicale ou une cathéterisation. Cette bactérie est responsable d'infections oculaires telles que des conjonctivites, des kératites et des ulcères de la cornée chez les porteurs de lentilles de contact ou contractées suite à l'extraction d'une cataracte. Cette bactérie est fréquemment isolée de lésions de la peau, toutefois le lien avec la pathologie est difficile à établir (Denton & Kerr, 1998).

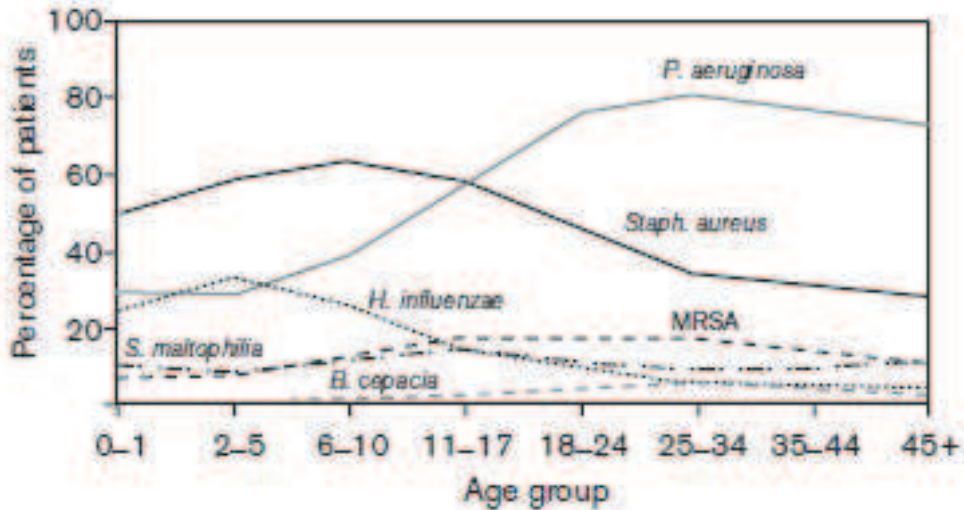


Figure 10. Prévalence des infections bactériennes chez les patients atteints de mucoviscidose en fonction de l'âge (Harrison *et al.*, 2007).

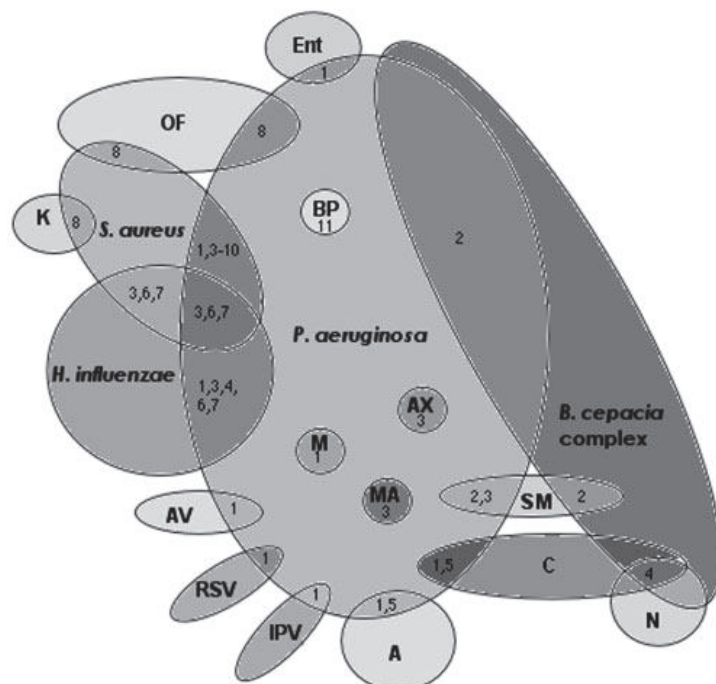


Figure 11. Co-infections rapportées dans les poumons de patients CF. A, *Aspergillus* spp.; AV, adenovirus; AX, *A. xylosoxidans*; BP, bacteriophage; C, *Candida* spp.; Ent, *Enterobacteria*; IPV, influenza and/or parainfluenza virus; K, *Klebsiella* spp.; M, *mycoplasma*; MA, *Mycobacterium abscessus*; N, *Neisseria* spp.; OF, oropharyngeal flora; RSV, respiratory syncytial virus; SM, *S. maltophilia* (Harrison *et al.*, 2007).

Un certain nombre de points communs entre les deux modèles a pu être mis en évidence dans cette section. Ces bactéries sont des pathogènes opportunistes majeurs de part leur implication dans un grand nombre d'infections nosocomiales. En particulier, elles sont fréquemment impliquées dans des bactériémies et semblent avoir des capacités importantes à coloniser et établir des pathologies dans les voies respiratoires des patients fragilisés. Elles semblent moins souvent à l'origine d'infections touchant d'autres systèmes ou organes mais les pathologies associées restent graves.

- *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* chez les personnes atteintes de mucoviscidose

La mucoviscidose est la maladie génétique grave la plus fréquente en France et le nombre de nouveaux cas par an est compris entre 160 et 200. C'est une maladie létale, toutefois grâce au progrès de la médecine, l'espérance de vie est aujourd'hui de 40 ans alors qu'elle n'était que de 5 ans dans les années soixante. Cette affection est liée à des mutations du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), situé sur le chromosome 7 et qui code pour une protéine nommée Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. Une anomalie dans cette protéine entraîne un dysfonctionnement généralisé des glandes exocrines ce qui provoque un épaissement des sécrétions muqueuses et une richesse de la sueur en chlore et en sodium. Les manifestations cliniques les plus souvent rencontrées sont respiratoires et digestives. Toutefois, des manifestations pancréatiques, hépatiques et génitales (stérilité) peuvent être observées.

Au niveau du système respiratoire, l'épaississement du mucus va empêcher le fonctionnement normal des cils vibratoires empêchant l'élimination des particules étrangères aboutissant progressivement à une obstruction des voies respiratoires. L'élimination des microorganismes (bactéries, virus, champignons) n'est également pas réalisée, ce qui entraîne le développement dans un premier temps d'infections aiguës auxquelles succèdent bien souvent des infections chroniques, pouvant dans les deux cas entraîner la mort du malade. Différentes bactéries sont impliquées dans ces infections et leur prévalence varie en fonction de l'âge du patient (Figure 10). De plus, les co-infections sont communes avec en moyenne 2,9 espèces bactériennes pathogènes par patient (Figure 11) (Harrison, 2007).

La bactérie la plus fréquemment isolée d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose est *P. aeruginosa*. Soixante dix à 80 % des patients atteints de mucoviscidose sont colonisés par cette bactérie. L'origine des souches restent dans la plupart des cas inconnue. Les sources probables sont l'environnement du malade, la transmission de patient à patient ou *via* des objets contaminés. *P. aeruginosa* peut apparaître très tôt et est isolée de façon intermittente au cours de l'enfance. Une infection chronique peut se développer conduisant rapidement à une détérioration des poumons. Toutefois, l'utilisation d'un traitement antibiotique adapté dès le premier isolement peut conduire à retarder la mise en place de l'infection chronique. Ce type de traitement n'est cependant pas efficace sur toutes les souches, en particulier, il n'a pas d'effet sur les clones épidémiques présentant des multi-résistances tels que les clones épidémiques de Liverpool (souches LES) (Foweraker, 2009). Il semble également que les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose ont une grande capacité d'adaptation à leur environnement. Certaines sont notamment qualifiées d'hypermutable du fait de mutations sur les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Des mutations induisant des résistances aux antibiotiques vont alors être sélectionnées sous la pression antibiotique forte (Oliver, *et al.*, 2000). *S. maltophilia*, quant à elle est de plus en plus fréquemment isolée des expectorations de personnes atteintes de mucoviscidose (Emerson, *et al.*, 2010). Cette présence est plutôt intermittente et n'est que rarement associée avec une détérioration des poumons. Il est également intéressant de noter que les co-infections avec *P. aeruginosa* sont fréquentes (Goss, *et al.*, 2004).

II- Génome et structure génétique des populations de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*

Le génome de différentes souches de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* a été récemment séquencé. L'analyse et la comparaison de ces génomes a permis de mieux comprendre les capacités d'adaptation de ces bactéries. De plus, différentes études de diversité ont montré d'une part, une grande diversité dans les populations au sein d'un même écosystème et d'autre part, la capacité de certains clones à coloniser un grand nombre d'écosystèmes différents.

II-1- Structure génétique des populations

Les méthodes et techniques de génétique des populations, appliquées depuis les années 90 aux bactéries ont permis de définir trois types de structure génétique des populations bactériennes. Les premières études ont montré que les populations de la plupart des espèces bactériennes étaient structurées de façon clonale, présentant peu de génotypes différents parmi les nombreux possibles. Ce type de structure repose sur un faible taux de recombinaison de larges segments chromosomiques qui est insuffisant pour que les associations d'allèles soient faites au hasard et que l'association clonale soit ainsi supprimée. L'étude de Maynard Smith et collaborateurs a montré que certaines populations bactériennes pouvaient également être panmictiques, avec des associations d'allèles faites au hasard, conduisant à la présence de nombreux génotypes différents au sein d'une même population ; ou bien épidémiques, dans lesquelles l'association des allèles se fait majoritairement au hasard dans une population avec certaines associations qui dominent, entraînant l'émergence de clones majoritaires (Smith, *et al.*, 1993).

La structure génétique des populations de *P. aeruginosa* a fait l'objet de nombreuses études dont les conclusions ont évolué au cours du temps. En 2000, Kiewitz et Tummler ont investigué la structure génétique de *P. aeruginosa* par multilocus sequence typing (MLST). Pour cela, 6 gènes choisis selon 3 critères : une position chromosomique, des fonctions de ménage et accessoires, des localisations différentes de leur produit, ont été amplifiés et séquencés chez 19 souches de *P. aeruginosa* d'origine environnementale (aquatique) et clinique. Cette étude a mis en évidence un faible taux de substitution de nucléotides ainsi qu'un fort taux de recombinaison entre les différents génotypes de *P. aeruginosa*, entraînant une association au hasard des allèles et suggérant ainsi une structure panmictique de la population (Kiewitz & Tummler, 2000). Il est intéressant de noter que les différents génotypes sont présents dans les différents environnements colonisés par *P. aeruginosa*. Autrement dit, il ne semble pas y avoir de spéciation ou adaptation des différents clones au milieu clinique ou à l'environnement. Les différents clones seraient ainsi tous capables de coloniser différentes niches.

En revanche, les études plus récentes seraient plutôt en faveur de l'hypothèse d'une structure épidémique des populations de *P. aeruginosa*. En 2002, une étude de Pirnay et collaborateurs menée sur 73 souches d'origine variée et utilisant quatre méthodes de typage différentes, est l'une des premières à suggérer une structure épidémique. Les résultats obtenus ont montré une organisation en mosaïque du génome de *P. aeruginosa* constitué de régions fortement

conservées et de régions variables, suggérant une structure panmictique de la population. Toutefois, certains complexes clonaux définis par des caractéristiques communes malgré des origines différentes, ont été majoritairement trouvés (Pirnay, *et al.*, 2002). Des études utilisant des techniques de PFGE après digestion avec l'enzyme de restriction *SpeI*, d'analyse de single nucleotide polymorphism (SNP) ainsi que le séquençage de génome complet par shotgun ont étayé cette hypothèse (Spencer, *et al.*, 2003, Morales, *et al.*, 2004). Ces études ont également mis en évidence l'implication de la structure du génome de *P. aeruginosa* dans la variabilité des différents génotypes observés. En particulier, les échanges d'éléments génétiques mobiles par transferts horizontaux seraient à l'origine du fort taux de recombinaison, induisant une structure non clonale.

Parmi les clones retrouvés à plusieurs reprises dans des environnements très différents, le clone C a fait l'objet de nombreuses études. Notamment, l'étude menée par Romling et collaborateurs a mis en évidence la présence de ce clone chez des patients atteints ou non de mucoviscidose, dans l'environnement clinique et dans différents environnements aquatiques séparés d'environ 300 km des hôpitaux (Romling, *et al.*, 1994). De plus, ce clone est dominant dans les différents écosystèmes étudiés, représentant entre 7 et 28 % de la population présente. Les raisons du succès de ce clone dans la colonisation de différents écosystèmes restent à ce jour à élucider, il ne serait toutefois pas lié à une meilleure capacité à former des biofilms ou bien à des résistances aux antibiotiques particulières (Romling, *et al.*, 2005).

Enfin, en 2007, les travaux de Wiehlmann et collaborateurs menée sur 240 souches cliniques et environnementales de *P. aeruginosa* par analyse de séquences amplifiées hybridées sur puce à ADN suggèrent que ces souches se divisent en deux grands groupes et 45 complexes clonaux constitués de quelques souches indépendamment de leur origine, chaque complexe préférant une association particulière du génome conservé et du génome accessoire (Wiehlmann, *et al.*, 2007). Cette étude suggère également que les zones de fort taux de recombinaison sont présentes dans le génome accessoire mais également dans le génome conservé.

Un consensus semble toutefois avoir été trouvé. La structure génétique de la population de *P. aeruginosa* serait non clonale et épidémique. Les isolats cliniques et environnementaux seraient indifférenciables et il n'y aurait pas de clone adapté à des environnements particuliers tels que le milieu clinique. La structure de son génome, organisé en génome « cœur » fortement conservé, ponctué d'éléments génétiques mobiles tels que les îlots génomiques échangés entre souches par transfert horizontal, serait à l'origine de la diversité observée.

Toutefois, certaines interrogations demeurent. En particulier, cette hypothèse semble difficile à vérifier si on s'intéresse à certains clones isolés de patients atteints de mucoviscidose, qui semblent présenter des adaptations particulières à l'environnement constitué par les poumons et qui sont transmis et se répandent au sein des populations de malades. De même, certaines souches multi-résistantes aux antibiotiques émergent et persistent dans le milieu clinique en particulier dans les unités de soins intensifs où une forte pression antibiotique est appliquée. Une étude récente de Pirnay et collaborateurs a eu pour objectif de compléter leur étude réalisée en 2002 et de reconsidérer la structure génétique de la population de *P. aeruginosa* en intégrant ces clones particuliers (Pirnay, *et al.*, 2009). Pour cela, leurs travaux ont été menés sur 328 isolats collectés au cours des 125 dernières années, de différents habitats cliniques et environnementaux dans 69 localités de 30 pays sur les 5 continents. Différentes analyses ont été réalisées sur ces souches telles que l'analyse du sérotype, une analyse génotypique par fluorescent amplified-fragment length polymorphism (FAFLP) ou encore le séquençage de gènes codant pour des protéines membranaires. L'ensemble des résultats obtenus confirme une structure génétique épidémique non clonale de la population de *P. aeruginosa* dans laquelle les recombinaisons sont fréquentes, avec des souches d'origines différentes pouvant présenter le même génotype et dans laquelle certains clones épidémiques particulièrement performants émergent. De plus, aucune preuve en faveur de clone sélectionné, transmis au sein des populations de patients atteints de mucoviscidose n'a pu être mise en évidence.

En ce qui concerne *S. maltophilia*, le niveau de connaissance n'est pas le même que pour *P. aeruginosa*. Toutefois, différentes études de diversité ont été réalisées. Notamment, l'étude de Berg et collaborateurs, menée sur 40 souches de *S. maltophilia* isolées de patients ou de l'environnement (milieu aquatique ou associées aux plantes) a été réalisée par des méthodes phénotypiques telles que l'évaluation de la résistance aux antibiotiques et de différentes activités métaboliques, ainsi que des méthodes génotypiques telles que la PFGE après digestion avec l'enzyme de restriction *DraI* (Berg, *et al.*, 1999). Les résultats obtenus suggèrent une grande diversité entre les souches testées. Aucune différence au niveau des résistances aux antibiotiques ne semble exister entre souches d'origine clinique et souches d'origine environnementale. De même, l'analyse de l'ensemble des résultats phénotypiques et génotypiques ne révèle pas de groupement de souches en fonction de leur origine. Ainsi, tout comme il l'a été envisagé pour *P. aeruginosa*, les différents clones de *S. maltophilia* seraient capables de coloniser différentes niches écologiques et ne seraient pas inféodés à des milieux particuliers tel que le milieu clinique.

De plus, une étude plus récente a montré que la diversité au sein de la population de *S. maltophilia* d'un même hôpital était très élevée (Valdezate, *et al.*, 2004). L'analyse génétique par PFGE après restriction avec l'enzyme *XbaI* de 139 souches issues de patients atteints de mucoviscidose, des services de soins intensifs, de chirurgie et de l'environnement d'un même hôpital a permis d'identifier 99 profils différents. Ces profils sont répartis dans cinq grands clusters dont deux majoritaires, indépendamment de l'origine des souches. Toutefois, la présence de certains clones retrouvés à la fois chez différents patients ainsi que sur du matériel médical suggère une origine commune à différentes infections. Ainsi, une importante diversité est observée au sein de la population de *S. maltophilia* issue d'un même hôpital certainement du fait de la versatilité et de la grande adaptabilité de cette bactérie avec la possibilité de transmission de quelques clones pouvant conduire à des épidémies. Même si aucune hypothèse sur la structure génétique de *S. maltophilia* n'est émise dans ces études, les résultats obtenus seraient plutôt en faveur d'une structure panmictique ou épidémique du fait de l'importante diversité obtenue et de l'émergence parfois de certains clones dans le milieu clinique.

II-2- Le génome de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*

Les génomes de 4 souches de *P. aeruginosa* sont à ce jour disponibles. Ces souches, toutes d'origine clinique, ont été choisies pour leur différent niveau de virulence et les types de pathologies qu'elles entraînent. La première souche à avoir été séquencée est la souche PAO1 (Stover, *et al.*, 2000). Cette souche, isolée d'une blessure, est la plus utilisée en laboratoire et est de ce fait considérée comme la souche de référence de *P. aeruginosa*. La deuxième souche à avoir été séquencée est la souche PA14, également isolée d'un patient, présentant une plus forte virulence que PAO1 à la fois chez l'Homme et dans différents modèles d'hôtes notamment le modèle murin et les plantes (He, *et al.*, 2004). La souche LESB58 appartenant au groupe des LES (pour Liverpool Epidemic Strains) a également été séquencée (Winstanley, *et al.*, 2009). Ces souches ont la particularité d'être les plus souvent isolées des patients atteints de mucoviscidose au Royaume Uni et en Australie. De plus, elles sont fréquemment responsables de surinfections, sont associées à une plus forte mortalité que les autres souches de *P. aeruginosa* et présentent des capacités élevées de survie sur les surfaces sèches. Ces souches présentent également un phénotype inhabituel, produisant des facteurs de virulence très tôt dans la courbe de croissance, ce sont également des souches

hyper-productrices de biofilm et qui mutent assez facilement pour acquérir des résistances aux antibiotiques les plus utilisés en thérapie tels que les carbapénèmes (méropénème), les monobactames (aztréonam), les aminoglycosides (tobramycine) et les quinolones (ciprofloxacine). Enfin, la dernière souche à avoir été séquencée est la souche PA7 (Roy, *et al.*, 2010). Cette souche est un isolat clinique non pulmonaire d'Argentine. Elle est particulièrement intéressante du fait qu'elle présente un profil de résistance aux antibiotiques inhabituel avec une importante capacité de résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (ceftazidime), aux monobactames et quinolones. De plus, le séquençage d'un certain nombre de gènes de ménage ou codant pour des résistances montrent que cette souche forme un clade à part au sein de la phylogénie de *P. aeruginosa*. Plusieurs autres génomes ont été séquencés dans un but de comparaison de génomes. Toutes ces souches ont une origine clinique et aucun génome de souches environnementales n'est à ce jour disponible.

En ce qui concerne *S. maltophilia*, 2 génomes ont été récemment séquencés. Le premier est celui de la souche d'origine clinique K279a (Crossman, *et al.*, 2008). Cette souche a été isolée du sang d'un patient sous chimiothérapie qui a développé une bactériémie pour laquelle la thérapie avec différents antibiotiques tels que la pipéracilline associée au tazobactam, le ceftazidime et l'imipénème n'a eu aucun effet. Cette souche, phylogénétiquement rattachée à *S. maltophilia* et présentant un phénotype de résistance aux antibiotiques classique a été considérée comme un bon représentant de l'espèce pour le séquençage du génome. Le deuxième génome disponible est celui d'une souche environnementale endophyte du peuplier (Taghavi, *et al.*, 2009). Cette souche a été séquencée dans le but de mieux appréhender les mécanismes induisant une stimulation de la croissance des plantes. Pour cela, plusieurs génomes de bactéries endophytes du peuplier et du saule appartenant à la classe des γ -protéobactéries ont été séquencés et comparés, parmi lesquels celui de la souche de *S. maltophilia* R551-3.

La comparaison des différents génomes séquencés a permis de mieux comprendre l'organisation des génomes et d'identifier les gènes indispensables aux deux modèles pour leur survie et les gènes qui vont améliorer leur adaptation aux différents environnements rencontrés et la réussite des interactions établies avec les autres organismes vivants.

II-2-a- Structures des génomes

Les génomes bactériens sont constitués d'une partie fortement conservée au sein de l'espèce, cette part du génome est appelé génome cœur. Les gènes présents dans le génome cœur sont considérés comme indispensables à la survie et à la multiplication de la bactérie dans son habitat. Au sein de ce génome cœur, s'intègre des parties non conservées, souches spécifiques qui peuvent avoir été acquises par transfert horizontal. Cette partie du génome est appelée génome accessoire, elle regroupe des gènes non essentiels à la survie de la bactérie mais qui lui permettrait une meilleure adaptation à son environnement.

Le génome de *P. aeruginosa* est constitué par un chromosome circulaire, il est caractérisé par un haut taux en GC (environ 66 %), une grande taille, variant de 5,2 à 7 Mbp et possède entre 5500 et 6200 cadres ouverts de lecture (ORF pour Open Reading Frames) (Tableau 3).

Tableau 3. Caractéristiques générales des génomes séquencés de *P. aeruginosa* (Roy *et al.*, 2010).

	PA7	PAO1*	PA14*	LESB58*
Genome Size (bp)	6,588,339	6,264,404	6,537,648	6,601,757
G+C content	66.5	66.6	66.3	66.3
protein coding genes	6286	5566	5892	5925
% coding	89	89	89	88
structural RNAs [†]	75	77	72	81
pseudogenes	8	5	none	34
Assigned function[‡]				
Translation, ribosomal structure and biogenesis	206	205	205	199
Transcription	530	516	537	501
DNA replication, recombination and repair	235	160	185	145
Cell division and chromosome partitioning	37	34	35	34
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	215	200	210	201
Cell envelope biogenesis, outer membrane	260	265	266	261
Cell motility and secretion	152	150	154	149
Inorganic ion transport and metabolism	355	376	377	313
Signal transduction mechanisms	346	337	345	337
Energy production and conversion	336	329	340	330
Carbohydrate transport and metabolism	250	252	249	196
Amino acid transport and metabolism	571	587	590	490
Nucleotide transport and metabolism	105	108	110	104
Coenzyme metabolism	192	191	192	210
Lipid metabolism	245	244	248	234
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	198	205	212	171
General function prediction only	759	756	771	603
Function unknown	503	476	493	500

Les études de comparaison de génomes suggèrent que son génome est organisé en mosaïque, constitué de blocs de gènes conservés entre les souches, interrompus par des blocs de gènes spécifiques de chaque souche (Mathee, *et al.*, 2008, Roy, *et al.*, 2010). Ces derniers sont

insérés dans des zones précises, souvent au niveau des ARN de transfert. Le génome cœur représente environ 90 % du génome de *P. aeruginosa*. Le génome accessoire de *P. aeruginosa* est constitué de zones où sont insérés les segments d'ADN accessoires, appelés régions de plasticité génomique (Figure 12). Selon Mathee et collaborateurs (Mathee, *et al.*, 2008), ces zones sont caractérisées par la présence de séquences souches spécifiques d'au moins 4 ORFs, flanquées de séquences d'ancrage conservées et sont absentes chez au moins une souche. Ces zones englobent les séquences issues de phages, les îlots génomiques ou des séquences perdues par une ou plusieurs souches. La taille du génome accessoire est variable d'une souche à l'autre, allant d'une dizaine de régions de plasticité génomique chez PAO1 à 51 chez PA7.

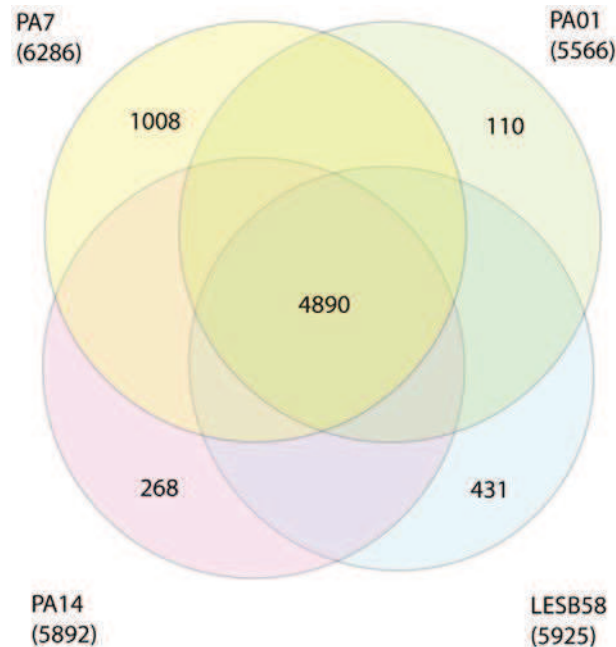


Figure 12. Comparaisons des génomes séquencés de *P. aeruginosa*. Le génome cœur est constitué de 4890 gènes, commun aux 4 souches séquencées. La taille du génome accessoire varie en fonction de la souche avec un minimum de 110 ORFs chez PAO1 et un maximum de 1008 ORFs chez PA7 (Roy *et al.*, 2010).

Dans la suite de cette partie nous apporterons un intérêt particulier aux îlots génomiques. Ces îlots sont fréquemment acquis par transfert horizontal, leur pourcentage en GC diffère de celui du reste du génome, de même que l'usage des codons (toutefois, ces différences peuvent être moins évidentes si l'acquisition est ancienne). Ces îlots sont fréquemment encadrés par des hotspots de recombinaison ou insertion type ARNt ou séquences répétées inversées (Figure 13).

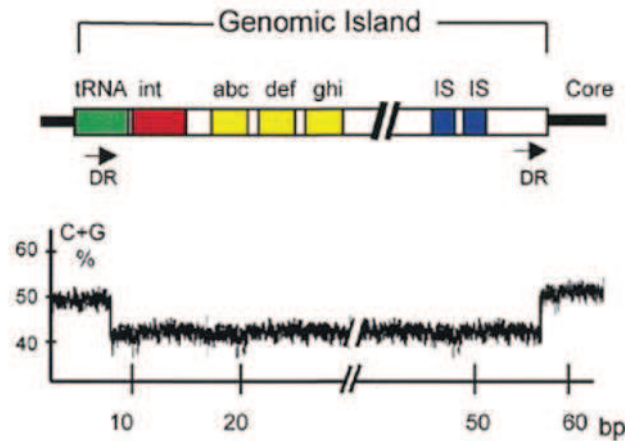


Figure 13. Modèle schématique d'un îlot génomique bactérien (Hacker & Carniel, 2001).

Le génome de *S. maltophilia* est également constitué d'un seul chromosome circulaire et est caractérisé par un haut pourcentage en GC (environ 67 %). Les génomes des souches K279a et R551-3 ont un pourcentage en GC similaire mais présentent des longueurs variables, celui de K279a étant plus long (4,8 Mbp) que celui de R551-3 (4,5 Mbp). Malgré cette différence, l'organisation des génomes est semblable, la syntenie est élevée et les séquences s'alignent parfaitement sur toute leur longueur (Figure 14). De plus, on observe que 85 % des gènes sont communs entre les deux souches. La variabilité entre les souches s'explique surtout par la présence de nombreux îlots génomiques. En effet, 41 îlots ont été identifiés chez la souche K279a et 36 chez la souche R551-3 (Rocco, *et al.*, 2009).

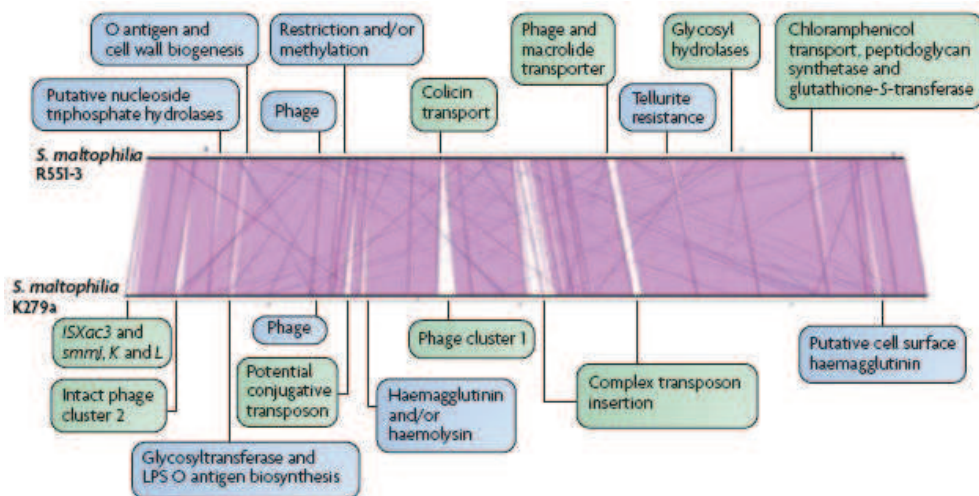


Figure 14. Comparaison des génomes séquencés de *S. maltophilia* (Ryan *et al.*, 2009).

II-2-b- Composition des génomes cœur et accessoire

Le séquençage des différentes souches de *P. aeruginosa* a permis de mettre en évidence la présence de certains gènes codant pour des fonctions particulièrement importantes pour la survie et la multiplication de *P. aeruginosa* ainsi que pour son adaptation à différents environnements et différents hôtes.

Le séquençage du génome de la souche PAO1 a notamment révélé la présence d'un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation (Stover, *et al.*, 2000). En effet, 468 ORFs présentent des motifs caractéristiques de régulateurs transcriptionnels ou de senseurs de l'environnement. La forte prévalence de ces gènes s'expliquent d'une part par la taille importante du génome de cette bactérie et d'autre part, par le besoin de s'adapter à différents environnements ou modifications environnementales. Ainsi, à taille de génome équivalent, certaines espèces inféodées à des niches écologiques étroites telles que *Mycobacterium tuberculosis* (pathogène strict) ne présente pas plus de 3% de gènes impliqués dans la régulation alors que chez *P. aeruginosa*, cette proportion atteint 8,4 % des gènes. De plus, différentes études sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle la versatilité et la grande capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* seraient liée à ses capacités de régulation plutôt qu'à l'acquisition d'éléments génétiques mobiles de type plasmide ou transposon (Rodrigue, *et al.*, 2000, Gooderham & Hancock, 2009). On remarque également la présence d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines membranaires. Ces dernières sont impliquées dans différentes fonctions indispensables à tout organisme telles que l'apport de nutriments mais également à des fonctions liées au mode de vie d'une bactérie pathogène opportuniste telle que *P. aeruginosa* comme par exemple, l'efflux de molécules toxiques, en particulier d'antibiotiques, l'exportation de facteurs de virulence ou la reconnaissance par l'hôte. Ces gènes, appartenant au génome cœur de *P. aeruginosa* sont fortement conservés au sein des génomes séquencés. Toutefois, certains gènes codant pour des fonctions majeures présents dans le génome cœur sont absents ou altérés chez certaines souches séquencées. L'absence de fonction peut parfois être corrélée au mode de vie de la bactérie. Par exemple, l'absence de flagelles chez la souche LESB58, liée à des variations sur le gène codant pour les protéines impliquées dans leur synthèse, est associée à une faible agressivité (Winstanley, *et al.*, 2009). En effet, la perte des flagelles, responsable de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales, lui permet de passer inaperçu aux yeux du système immunitaire de l'hôte. Elle est de ce fait plus compétitive par rapport à des souches plus agressives telles que PAO1 ou PA14.

En ce qui concerne le génome accessoire de *P. aeruginosa*, les séquençages ont mis en évidence un grand nombre d'îlots génomiques. Une grande proportion des gènes présents sur ces îlots ont une fonction inconnue. Toutefois, l'implication de certains d'entre eux dans la virulence ou la résistance à des composés toxiques pour la bactérie tels que les antibiotiques ou les métaux a pu être mise en évidence. Notamment, le séquençage de la souche PA14 a permis d'identifier deux îlots génomiques impliqués dans la pathogénicité de cette souche, ces îlots ont été nommés PAPI-1 et PAPI-2 pour *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island 1 et 2 (He, *et al.*, 2004). Des mutations dans ces îlots n'altèrent pas les capacités de survie et de multiplication de la bactérie mais diminuent sa virulence dans le modèle murin et la plante. La plupart des gènes présents sur ces îlots n'ont pas de fonction connue. Toutefois, certaines ORFs semblent impliquées dans l'adhésion ou la sécrétion de facteurs de virulence. De plus, la mise en évidence d'homologies avec des séquences présentes dans les génomes d'autres bactéries pathogènes telles que *Yersinia pestis* ou *Salmonella enterica* en particulier en ce qui concerne PAPI-1, est en faveur de l'implication de cet îlot dans la virulence. Ceci suggère également une organisation en mosaïque et l'acquisition en plusieurs fois des éléments composant cet îlot. Différents îlots semblent également impliqués dans la résistance à différents composés toxiques. En particuliers, plusieurs gènes impliqués dans la résistance à des antimicrobiens sont retrouvés sur des îlots de la souche PA7, tels que les gènes permettant la résistance au sulfonamide, aux aminoglycosides (streptomycine, kanamycine) et au chloramphénicol (Roy, *et al.*, 2010). La présence de ces gènes sur des îlots potentiellement acquis par transfert horizontal peut expliquer le phénotype de résistance particulier de cette souche par rapport aux autres souches de *P. aeruginosa*. Des gènes de résistance aux métaux ont également été mis en évidence sur des îlots. Notamment, l'opéron *mer*, responsable de la résistance au mercure est présent chez les souches PA14, PA7 et LESB58. D'autres îlots semblent impliqués dans l'interaction avec l'hôte tel que celui codant pour la synthèse d'un système de sécrétion de type II présent chez PA7 ou dans l'amélioration de la compétitivité tel que celui responsable de la synthèse d'un antifongique : la pyolutéroïne chez LESB58.

D'autres îlots génomiques ont été identifiés chez d'autres souches de *P. aeruginosa* et ont fait l'objet d'études plus approfondies. Ainsi, 11 îlots, nommé PAGI-1 à PAGI-11 (PAGI pour *Pseudomonas aeruginosa* genomic island) ont été mis en évidence (Liang, *et al.*, 2001, Larbig, *et al.*, 2002, Klockgether, *et al.*, 2004, Battle, *et al.*, 2008). Parmi ces îlots, PAGI-2, mis en évidence dans le clone C, est certainement le plus connu. Cet îlot serait impliqué dans

différentes fonctions métaboliques et de transport telles que la biosynthèse du cytochrome c ainsi que dans la résistance au cuivre et au mercure (Klockgether, *et al.*, 2004). La présence de gènes codant pour la synthèse du cytochrome c chez une souche isolée de patients atteints de mucoviscidose peut s'expliquer par l'utilité pour la bactérie de faciliter sa prise en fer et d'inactiver le peroxyde d'hydrogène dans les poumons où les bactéries sont soumises à un stress oxydatif et une limitation en fer. En revanche, la présence de gènes de résistance aux métaux ne semble pas représenter un avantage dans ces conditions. La présence de cet îlot et de ces gènes en particulier chez des souches environnementales de *P. aeruginosa* mais également chez d'autres espèces semblent plus pertinente. Notamment, cet îlot est également retrouvé chez *Cupriavidus metallidurans* CH34, bactérie isolée d'une citerne de décantation contenant de fortes concentrations en métaux lourds et connue pour ses grandes capacités de résistance. La présence de l'îlot dans des espèces différentes est en faveur de sa mobilité et de son acquisition par transfert horizontal. Toutefois, Klockgether et collaborateurs ont montré que le taux d'excision de cet îlot est faible, de ce fait les échanges semblent peu fréquents (Klockgether, *et al.*, 2007). L'îlot PAGI-5, isolé de la souche clinique PSE9, a montré quant à lui une implication dans la virulence. Cet îlot est formé de deux parties, l'une fortement homologue à PAPI-1 et la deuxième, constituée de nouvelles séquences. L'absence de cette dernière partie diminue fortement la virulence de la souche (Battle, *et al.*, 2008).

Ainsi, le génome de *P. aeruginosa* est constitué d'un génome cœur fortement conservé, correspondant à environ 90 % du génome total. Parmi les gènes identifiés dans ce génome cœur, on retrouve, en plus des gènes indispensables à la bactérie, des gènes impliqués dans la réussite des interactions à la fois avec son environnement et différents hôtes, tels que les gènes de résistance et de virulence. Le génome accessoire de *P. aeruginosa*, majoritairement constitué d'îlots génomiques, semble lui conférer des capacités particulières permettant à la bactérie d'améliorer ses conditions de survie en lui conférant des résistances ou des facteurs de virulence supplémentaires.

Chez *S. maltophilia*, on remarque que le génome cœur représente également une forte proportion du génome total (85 %). Il comprend les gènes essentiels à la multiplication et au métabolisme de la bactérie mais également des gènes de résistance à différents composés toxiques, ainsi que des gènes potentiellement impliqués dans la colonisation de l'hôte et dans le succès de l'interaction (Ryan, *et al.*, 2009). Trente sept gènes ou opérons ont été identifiés comme potentiellement impliqués dans la résistance à des composés toxiques au sein des deux génomes séquencés. Parmi ces gènes, 24 sont conservés dans les deux génomes et seulement

13 sont présents chez l'une ou l'autre des souches. On remarque qu'un grand nombre de ces gènes code pour des pompes à efflux non spécifiques, en particuliers des pompes de type RND (Resistance Nodulation cell Division). Des gènes codant pour des systèmes plus spécifiques seraient également présents, permettant notamment la résistance à des antibiotiques de la famille des aminoglycosides, quinolones, macrolides ou encore β -lactamines. D'autres gènes semblent impliqués plus particulièrement dans la résistance aux métaux lourds tels que le zinc, cadmium, cobalt, cuivre ou arsenic. Plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la formation de pili, notamment des pili de type I et IV sont également présents chez les deux souches. Des systèmes homologues présents chez d'autres espèces bactériennes pathogènes de plantes ou de l'Homme, interviennent dans la formation de biofilms, dans l'adhérence, la motilité ou la pathogénicité, suggérant un rôle important de ces gènes dans l'interaction de *S. maltophilia* avec ses différents hôtes. Ainsi, l'absence de réarrangement majeur au sein des génomes des deux souches ainsi que la forte proportion de gènes conservés entre K279a et R551-3 suggèrent que toutes les souches de *S. maltophilia* sont capables de s'adapter à un large panel d'environnements et d'établir des interactions avec différents organismes. De plus, la présence de gènes potentiellement impliqués dans la résistance et la colonisation, à l'origine du succès de *S. maltophilia* en tant que pathogène opportuniste, à la fois chez une souche clinique et une souche environnementale suggère une polyvalence des souches quelle que soit leur origine. Ainsi, toutes les souches de *S. maltophilia* seraient intrinsèquement capables de survivre dans le milieu hospitalier et le fort niveau de résistance observé chez les souches d'origine clinique n'aurait pas été acquis sous la pression antibiotique présente mais serait une propriété intrinsèque de l'espèce.

La source majeure de variation des génomes de *S. maltophilia* est représentée par la présence ou l'absence d'ilots génomiques. En effet, chaque génome est ponctué d'environ 40 ilots, aucun n'est commun aux deux souches mais certains peuvent porter les mêmes fonctions (Rocco, *et al.*, 2009). On remarque que certaines fonctions sont redondantes de celles du génome cœur, suggérant une importance particulière de ces fonctions (Tableau 4).

III- Mécanismes impliqués dans la réussite de l'interaction avec l'hôte et l'environnement : Virulence et Résistances

De nombreuses études ont été menées dans le but d'élucider les mécanismes à l'origine de la grande capacité d'adaptation et d'interactions avec d'autres organismes de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. Dans cette partie, nous nous intéresserons en particulier aux mécanismes qui permettent à ces deux pathogènes opportunistes de coloniser et créer des dommages chez un hôte, ainsi que de résister aux antibiotiques. Ces capacités particulières, bien que essentiellement étudiées chez des isolats cliniques, peuvent également intervenir dans l'adaptation à différents environnements. Les mécanismes de résistance aux métaux seront également abordés du fait de leur rôle dans la survie dans des environnements contaminés et de leur possible association aux mécanismes de résistance aux antibiotiques.

III-1- Le pouvoir pathogène

La mise en évidence des capacités qui permettent à *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* de coloniser l'hôte et entraîner des pathologies a fait l'objet de nombreuses études. De nombreux facteurs de virulence ont été décrits. Ces facteurs permettent à ces pathogènes opportunistes de coloniser l'hôte dont les barrières immunitaires sont défaillantes, de s'installer dans différents organes ou tissus et de causer diverses lésions. Leur capacité à former des biofilms, structures formées d'une association de cellule dans une matrice extracellulaire, constitue un avantage à ces bactéries en les protégeant contre les antimicrobiens et les défenses de l'hôte. Enfin, une attention particulière sera apportée à la capacité de ces bactéries à communiquer entre elles par quorum sensing, système permettant également la régulation d'un certain nombre de facteurs de virulence.

III-1-a- Facteurs de virulence

La pathogénie de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* est attribuée à la production de nombreux facteurs de virulence membranaires et extracellulaires (Figure 15). Les facteurs membranaires vont intervenir dans les étapes précoces de l'infection et vont essentiellement permettre la mobilité, la reconnaissance et l'adhésion aux cellules de l'hôte.

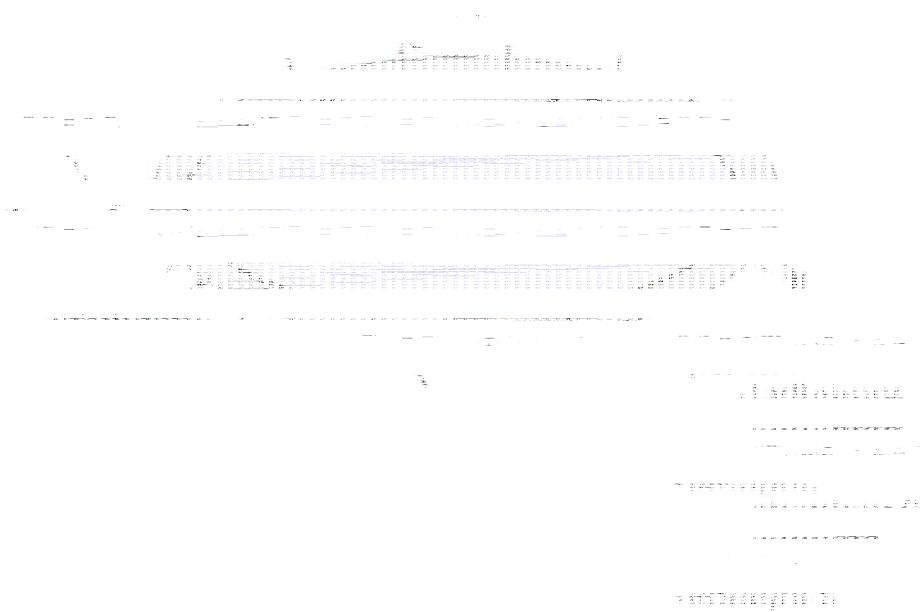


Figure 15. Les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* (Van Delden *et al.*, 1998).

Notamment, un certain nombre de facteurs impliqués dans la mobilité de ces deux bactéries semble indispensable à la réussite de l'infection. En particulier, la présence d'un flagelle chez *P. aeruginosa* est indispensable pour assurer la mobilité de la bactérie (Feldman, *et al.*, 1998). Il favorise également la prise de nutriments et jouerait un rôle dans l'adhésion aux cellules de l'hôte. *P. aeruginosa* est également capable de se déplacer par « twitching motility », surtout impliqué dans les déplacements sur les surfaces abiotiques, grâce à la présence de pili de type IV (Wall & Kaiser, 1999). Ces pili rétractables sont également impliqués dans l'adhésion aux cellules épithéliales des muqueuses de l'hôte. En ce qui concerne *S. maltophilia*, le séquençage du génome de la souche K279a a révélé la présence de gènes codant pour ce type de pili mais leur rôle dans la virulence reste à établir (Crossman, *et al.*, 2008). On retrouve également chez les deux modèles des fimbriae, facteurs impliqués dans l'adhésion aux surfaces abiotiques et dans la formation de biofilm (Vallet, *et al.*, 2001, de Oliveira-Garcia, *et al.*, 2003). Enfin, le lipopolysaccharide ou LPS intervient de plusieurs façons dans la réussite de l'infection (Lynn & Golenbock, 1992, Crossman, *et al.*, 2008). Localisé dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, le LPS est un lipide complexe auquel est attaché un polysaccharide : l'antigène O. Il est impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et possède une activité endotoxique responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire de l'hôte pouvant provoquer différents symptômes tels que fièvre, leucopénie, bradycardie, hypotension et choc septique.

Les facteurs extracellulaires vont intervenir lors de l'installation de la bactérie dans l'hôte et vont favoriser sa survie et sa multiplication, notamment en luttant contre le système immunitaire de l'hôte. *P. aeruginosa* est capable de produire et excréter plusieurs exotoxines. Elles sont directement injectées dans la cellule hôte grâce à la présence d'un système de sécrétion de type III, seringue macromoléculaire faisant le lien entre la bactérie et la cellule hôte. A ce jour, quatre toxines excrétées par ce système ont été identifiées : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY (Engel & Balachandran, 2009). ExoS et ExoT ayant respectivement une activité d'activateur de protéine Rho GTPase et une activité ADP ribosyltransférase, sont fonctionnellement étroitement liées. Ces toxines fonctionnent de concert pour interrompre le cytosquelette d'actine de la cellule hôte, bloquer la phagocytose par le macrophage et causer la mort de la cellule. Alors que le gène *exoT* est présent chez toutes les souches de *P. aeruginosa*, *exoS* est trouvé dans environ 70 % des isolats cliniques. ExoU est le produit le plus toxique injecté par *P. aeruginosa*. Le gène codant pour cette toxine est retrouvé chez environ 30 % des isolats cliniques et serait positionné sur un îlot de pathogénicité (Sato & Frank, 2004). Il code pour une phospholipase A2, active seulement après interaction avec un co-facteur présent chez l'hôte, tel que la superoxyde dismutase 1. ExoU est à l'origine d'une réponse inflammatoire excessive et cause des dommages tissulaires favorisant la dissémination des bactéries. Enfin, ExoY est une adénylate cyclase dépendante d'un co-facteur présent chez l'hôte. Ce co-facteur reste à ce jour non identifié et le rôle de cette enzyme dans la virulence est incertain (Veesenmeyer, *et al.*, 2009).

Les deux modèles sont également capables de produire différentes protéases dont la plus connue est l'élastase (Morihara, 1964, Denton & Kerr, 1998, Windhorst, *et al.*, 2002). Chez *P. aeruginosa*, l'activité élastolytique est due à deux enzymes, LasA et LasB codées par les gènes du même nom. Ces protéases sont capables de dégrader de nombreuses protéines de l'hôte telles que les composants des lames basales des structures épithéliales (l'élastine, la laminine, le collagène, les protéoglycanes), les composants du complément et certaines immunoglobulines (Toder, *et al.*, 1994). Ainsi, la participation des élastases à la détérioration de certaines molécules de défense de l'hôte reflète l'importance de ces enzymes dans la réussite de l'infection.

La présence de phospholipases C, enzymes extracellulaires, chez les deux modèles serait à l'origine de dommage des tissus pulmonaires suite à la dissolution par ces enzymes des surfactants, composés en grande partie de phospholipides, recouvrant ces tissus (Berka, *et al.*, 1981, Figueiredo, *et al.*, 2006, Crossman, *et al.*, 2008). La présence de rhamnolipides chez *P.*

aeruginosa favorise également les infections pulmonaires en perturbant le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire, en émulsionnant les phosphates membranaires par leur activité détergente (Read, *et al.*, 1992).

P. aeruginosa et *S. maltophilia* doivent également faire face au problème de l'insolubilité du fer sous sa forme Fe^{3+} , et doivent de ce fait excréter des molécules chélatant le fer : les sidérophores. Ces molécules vont leur permettre d'obtenir le fer des transferrines, des ferritines, de l'hémoglobine et d'autres protéines de l'hôte contenant du fer. Ces molécules sont ensuite captées par des protéines membranaires spécifiques présentes à la surface de la bactérie. Chez *P. aeruginosa*, on trouve trois types de sidérophores : la pyoverdine, la pyochéline et la pyocyanine qui vont être captées par la protéine membranaire FpvA (Schalk, *et al.*, 2002). En plus de leur rôle dans la captation du fer, différentes études ont montré que ces sidérophores interviennent directement dans la virulence notamment en causant des dommages tissulaires (Hassett, *et al.*, 1992). *S. maltophilia* produit un type de sidérophore appelé enterobactine mais possède également plusieurs récepteurs lui permettant de capter des sidérophores produits par d'autres bactéries (Ryan, *et al.*, 2009).

III-1-b- Formation de biofilm

P. aeruginosa et *S. maltophilia* sont capables de s'organiser en biofilm c'est-à-dire de former des structures résultant d'une association de cellules dans une matrice extracellulaire constituée de protéines sécrétées, de polysaccharides, d'acides nucléiques et de débris cellulaires, attachées à une surface biotique ou abiotique. Cette organisation constitue une barrière physique conférant à ces bactéries des avantages importants tels qu'une meilleure résistance à différents antibactériens, aux prédateurs et au système immunitaire de l'hôte. De ce fait, la formation de biofilm joue un rôle important dans la colonisation et l'installation de la bactérie chez l'hôte. De plus, leur capacité à former des biofilms sur des surfaces inertes, notamment sur le matériel médical augmente les risques de contaminations et les difficultés à éradiquer ces bactéries du milieu hospitalier.

La formation d'un biofilm nécessite plusieurs étapes, incluant l'attachement réversible de la bactérie à un substrat puis son adhésion irréversible, la formation de micro-colonies, la maturation du biofilm se manifestant par la formation de larges structures en forme de tiges ou de champignons, et enfin la dispersion de certaines bactéries du biofilm soit par le détachement d'une partie du biofilm soit par le départ de bactéries devenues mobiles (Figure

16). Un biofilm est constitué de microenvironnements dans lesquels les quantités de nutriments et d'oxygène vont être limitées et décroître en fonction de la profondeur dans le biofilm. Ceci conduit à un ralentissement de la croissance des bactéries présentes ainsi qu'à l'observation d'une hétérogénéité physiologique en fonction des concentrations en nutriments et en oxygène rencontrés.

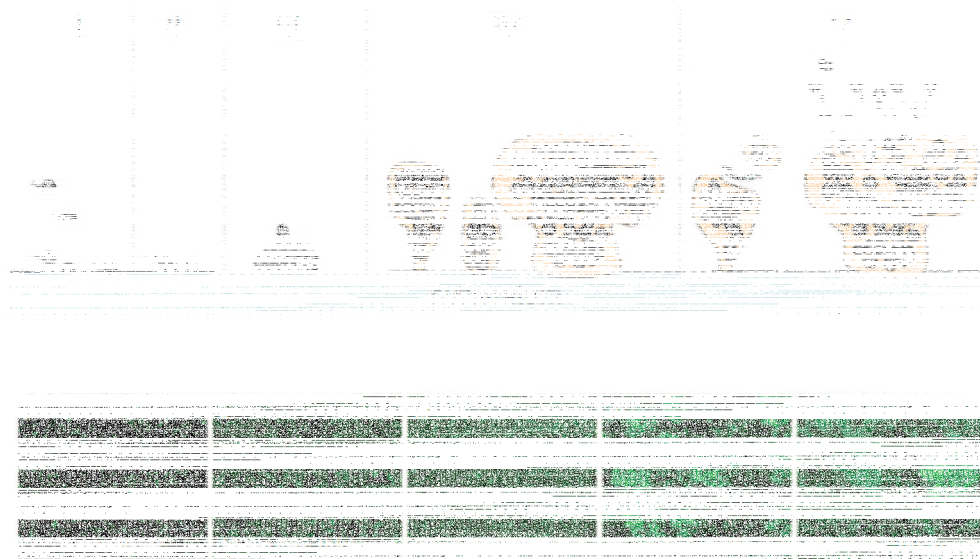


Figure 16. Formation d'un biofilm chez *P. aeruginosa*. I. Attachement réversible à la surface, II. Adhésion irréversible, III. Formation de micro-colonies, IV. Mise en place de structures complexes en forme de tiges ou de champignons, V. Détachement du biofilm. (Wagner & Iglewski, 2008).

Bien que la capacité de *S. maltophilia* à former des biofilms à la fois sur des surfaces biotiques et abiotiques soit connue depuis plusieurs années, les mécanismes à l'origine de sa formation sont peu étudiés. La présence d'un fimbriae SMF-1 (*Stenotrophomonas maltophilia* Fimbriae 1), présentant des homologies avec ceux présents chez des pathogènes comme *Escherichia coli*, serait impliqué dans l'adhésion des bactéries aux cellules eucaryotes et aux surfaces inertes. De plus, l'ajout d'anti-corps anti SMF-1 empêche la formation de biofilm, suggérant un rôle essentiel de ce fimbriae dans la mise en place d'une structure en biofilm (de Oliveira-Garcia, *et al.*, 2003). Le séquençage des génomes a également mis en évidence la présence de différents gènes potentiellement impliqués dans la mobilité et l'adhésion, tels que ceux codant pour le pili de type IV, ainsi que dans la synthèse de polysaccharides, composants essentiels de la matrice (Crossman, *et al.*, 2008).

Contrairement à *S. maltophilia*, de nombreuses études ont eu pour objet l'étude des mécanismes impliqués dans la formation du biofilm chez *P. aeruginosa*. La réussite de la formation et du maintien du biofilm formé par *P. aeruginosa* dans l'hôte ou sur des surfaces abiotiques va dépendre de différents facteurs intervenant à chaque étape de l'installation du biofilm. Tout d'abord, la présence du flagelle et la capacité de se déplacer par « twitching motility » sont notamment impliquées dans l'attachement de *P. aeruginosa* à différentes surfaces, ainsi que dans les étapes suivantes de la formation du biofilm (O'Toole & Kolter, 1998). Les souches présentant des mutations sur différents gènes impliqués dans la synthèse des pili sont incapables de former des biofilms caractéristiques de *P. aeruginosa* en forme de champignon. Parmi ces gènes, le gène *pilA*, codant pour la piline (protéine formant les pili) et le gène *lecB*, gène codant pour une lectine de type II (participant également à la formation des pili) semblent indispensables à la formation de biofilm et des mutations sur ces gènes entraînent la formation de biofilm fin et fragile. De plus, LecB intervient également dans la virulence de façon directe par sa capacité à entrainer un ralentissement des battements ciliaires de l'épithélium des poumons (Mewe, *et al.*, 2005, Tielker, *et al.*, 2005). De même, une mutation sur le gène *lecA* codant pour un autre type de lectines présentes à la surface de *P. aeruginosa*, semble également impliquée dans la structure du biofilm et conduit à la formation d'un biofilm plus fin que celui de la souche sauvage (Diggle, *et al.*, 2006).

La capacité à former les différents composés de la matrice est indispensable à la formation du biofilm. Notamment, la surproduction d'un exopolysaccharide, l'alginate par certaines souches de patients atteints de mucoviscidose entraîne un changement de phénotype de ces souches, alors qualifiées de mucoïdes (Hentzer, *et al.*, 2001). Chez ces souches, l'alginate est un des principaux composants de la matrice et est à l'origine de la formation d'un biofilm particulièrement résistant aux antimicrobiens tel que la tobramycine. L'alginate intervient dans l'élimination des radicaux libres relargués par les macrophages activés, prévient de la phagocytose et protège contre les défensines. Chez les souches non mucoïdes, l'alginate ne constitue pas le composant principal de la matrice et deux loci impliqués dans la synthèse d'autres polysaccharides : *psl* et *pel* ont été mis en évidence chez PAO1 et PA14, respectivement (Ryder, *et al.*, 2007). Toutefois, la synthèse d'alginate par ces souches serait possible en conditions hypoxiques, conditions notamment rencontrées dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose et participerait à la défense du biofilm contre le système immunitaire de l'hôte (Ramsey & Wozniak, 2005). L'ADN extracellulaire est aussi un

composant majeur de la matrice. La présence de DNase I empêche la formation du biofilm et dissout les jeunes biofilms (Whitchurch, *et al.*, 2002). Il a été mis en évidence que la quantité d'ADN ainsi que sa localisation dans le biofilm variaient au cours du temps. Dans les biofilms précoces, l'ADN est en grande quantité et se trouve principalement contre la surface et recouvre les micro-colonies alors que dans les biofilms matures, l'ADN se trouve dans les tiges des structures en champignon. Cet ADN aurait pour origine la lyse cellulaire induite par les prophages ou la libération de vésicules membranaires (Yang, *et al.*, 2007). Différentes études ont également révélé l'importance des rhamnolipides, glycolipides extracellulaires au pouvoir détergent, à toutes les étapes de la formation du biofilm, de la formation de micro-colonies à la dispersion des bactéries (Davey, *et al.*, 2003).

La capacité à survivre en présence de faibles quantités d'oxygène voire même en absence totale d'oxygène est également essentiel à la survie de *P. aeruginosa* dans le biofilm. En particulier, l'utilisation de la dénitrification, c'est-à-dire à l'utilisation des nitrates, nitrites et de l'oxyde nitreux comme accepteur terminal d'électrons constitue une alternative permettant le développement de la bactérie (Grasemann, 1999).

La régulation de la formation d'un biofilm est sous le contrôle de différents systèmes de régulation dont Crc régulateur du métabolisme global du carbone, RpoS régulateur de la phase stationnaire, AlgR régulateur de la production d'alginate, le système à trois composants GacA/GacS/*rsmZ*, mais elle implique surtout une coordination entre les cellules impliquées nécessitant une communication entre ces cellules rendue possible par le quorum sensing (Wagner & Iglewski, 2008).

III-1-c- Communication entre cellule et Quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un mécanisme de communication cellulaire permettant aux bactéries d'adapter leur comportement en fonction de la densité de population et de l'environnement et d'agir de façon coordonnée comme le ferait un organisme multicellulaire (Figure 17). Ce système implique la synthèse de petites molécules appelées auto-inducteurs qui sont libérées dans l'environnement. La concentration en auto-inducteurs va être perçue par les bactéries voisines qui vont en déduire la densité de population et réguler l'expression de gènes en conséquence.

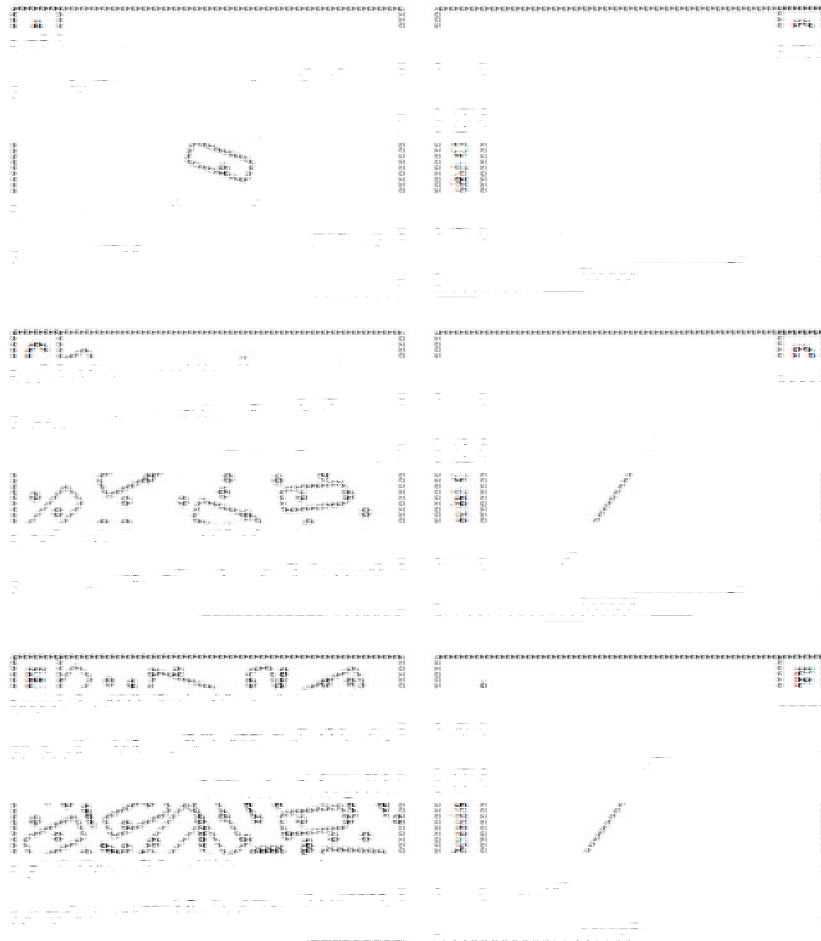


Figure 17. Principe de l'expression du quorum sensing au cours de la croissance bactérienne. La croissance bactérienne dans un milieu de culture (A, C, E) est suivie au cours du temps en fonction de la densité optique (B, D, F). Au cours de la phase de latence (A, B), la synthèse de petites molécules appelées acyl-homosérine lactones (AHL) représentées par de petits cercles gris augmente. Cette synthèse dépend d'une synthase auto-inductrice. Les AHL diffusent facilement de bactéries à bactéries. Lorsque la quantité d'AHL atteint un seuil critique à la jonction entre la phase de croissance exponentielle (C, D) et la phase stationnaire (E, F), les AHL déclenchent la production de facteurs de virulence (éclair noir). Cette production est coordonnée à toute la population bactérienne. (Ruimy *et al.*, 2004).

Chez *P. aeruginosa*, le QS est responsable de la régulation d'environ 350 gènes, soit 6 % de son génome, et est impliqué dans différents processus tels que la formation de biofilm ou la synthèse de toxines (Veesenmeyer, *et al.*, 2009). Trois systèmes de QS ont été mis en évidence. Le premier à avoir été décrit est le système *las* (Gambello & Iglewski, 1991). Ce système est constitué du gène *lasR* codant pour la protéine régulatrice LasR et du gène *lasI* codant pour l'auto-inducteur synthase LasI qui est indispensable à la synthèse de l'auto-inducteur N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL). Les N-acyl homosérine lactone sont des molécules qui ont la propriété de traverser facilement les membranes bactériennes et constituent un vrai moyen de communication entre les cellules.

Lorsque la concentration en 3-oxo-C12-HSL atteint un seuil critique, témoin d'une densité bactérienne élevée, une de ces molécules se lie à deux régulateurs LasR pour constituer un complexe activateur de la transcription de plusieurs gènes. Cette activation est déclenchée de manière synchrone dans toute la population bactérienne à la jonction entre la phase de croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire. Parmi les gènes régulés par ce système, plusieurs sont impliqués dans la virulence, tels que *lasB*, *lasA*, *aprA* codant respectivement pour deux élastases et pour une protéase alcaline, *toxA* codant pour une exotoxine ADP-ribosylante, *xcpR* et *xcpP* codant pour des protéines du système de sécrétion de type II nécessaire à l'exportation de ces facteurs hors de la cellule et *lasI* permettant une augmentation rapide de la synthèse de 3-oxo-C12-HSL et donc une amplification du signal par auto-induction.

Le deuxième système est le système *rhl* (Latifi, *et al.*, 1995). Ce système est également constitué d'une protéine régulatrice RhlR codée par le gène *rhlR* et une auto-inducteur synthase RhlI, codée par le gène du même nom. Cette enzyme est nécessaire à la synthèse d'un second type de N-acyl homosérine lactone : la N-butyryl-L-homosérine lactone (C4-HSL). Le complexe RhlR-C4-HSL contrôle l'expression de l'opéron *rhlAB* nécessaire à la production de rhamnolipides, et l'expression d'une série de gènes dont *lasA*, *aprA* et *rhlI*.

Des interactions existent entre ces deux systèmes. Notamment, le complexe LasR-3-oxo-C12-HSL active la transcription de *rhlR* et *rhlI*. De plus, les 3-oxo-C12-HSL peuvent entrer en compétition avec les C4-HSL pour le site de liaison à RhlI et pourraient ainsi agir comme un antagonisme du système *rhl*. Il existe donc une hiérarchie entre ces deux systèmes avec le système *las* qui régule positivement le système *rhl* (Latifi, *et al.*, 1995).

Les mécanismes régulant positivement l'expression des gènes *lasR* et *rhlR* sont encore mal connus. Ils semblent toutefois faire intervenir des signaux extérieurs, notamment par l'intermédiaire de systèmes de régulation. La régulation négative du système *las* est

actuellement attribuée à deux gènes *rsaL* et *qscR*. Le gène *rsaL* est situé immédiatement en aval de *lasR* et inhibe la synthèse de LasI. De plus, l'analyse du génome complet de *P. aeruginosa* a révélé l'existence d'un gène homologue à *lasR* nommé *qscR*. La protéine codée par ce gène inhibe également la transcription de *lasI* et pourrait ainsi assurer le contrôle du QS empêchant son déclenchement dans des environnements ne nécessitant pas sa mise en œuvre (Chugani, *et al.*, 2001).

Récemment, un troisième système appelé Pseudomonas Quinolone signal (PQS) a été mis en évidence (Diggle, *et al.*, 2003). Ce système implique la formation d'une molécule signal appelée 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone. La synthèse de cette molécule est sous le contrôle de LasR et active notamment la transcription des gènes *lasB* (codant pour l'élastase), *lecA* (codant pour une PA-IL lectine) et *rhl2*, constituant ainsi un lien supplémentaire entre les systèmes *las* et *rhl*. Plusieurs autres molécules régulant le QS, notamment d'autres acyl-homosérine lactones ont pu être détectées en faible quantité dans le surnageant de culture. Des molécules de dipeptides cycliques (diketopiperazines) ont également été retrouvées chez *P. aeruginosa* (Holden, *et al.*, 1999). Leur rôle reste encore hypothétique mais pourrait inhiber ou activer le QS selon l'environnement rencontré par les bactéries.

Le QS n'intervient pas dans la virulence de *P. aeruginosa* uniquement en stimulant l'expression de différents gènes codant pour des facteurs de virulence. Les N-acyl homosérine lactones interviennent directement dans la virulence par leur activité immuno-modulatrice. La 3-oxo-C12-HSL joue un rôle dans l'infection en inhibant la prolifération lymphocytaire, en réduisant la réponse inflammatoire (production de TNF α) induite par le LPS de *P. aeruginosa*. Cette molécule est également responsable de l'apoptose des macrophages et des polynucléaires neutrophiles (Telford, *et al.*, 1998).

Le QS est également impliqué dans la formation du biofilm, en intervenant dans l'étape de structuration. En effet, une souche mutée sur le gène *lasI* forme un biofilm fin, peu structuré et sensible à un détergent (le SDS). L'ajout de 3-oxo-C12-HSL restaure la structure du biofilm, confirmant le rôle essentiel du QS dans la formation du biofilm. Par contre, une mutation sur le gène *rhlI* n'entraîne pas de modification significative du biofilm (Davies, *et al.*, 1998). Il est aussi intéressant de noter que les molécules du QS produites par *P. aeruginosa* peuvent avoir un effet sur d'autres microorganismes présents. Il a notamment été montré que la 3-oxo-C12-HSL a un effet inhibiteur de la croissance de *Staphylococcus aureus* et de *Candida albicans*, parfois retrouvées simultanément avec *P. aeruginosa* lors de co-infection (Hogan, *et al.*, 2004, Hoffman, *et al.*, 2006).

Chez *S. maltophilia*, la communication entre cellules n'implique pas le même type de molécules que chez *P. aeruginosa*. En effet, l'analyse du protéome de *S. maltophilia* a révélé l'absence de N-acyl-homosérine lactone synthase. La communication est alors rendue possible par la synthèse de molécules appelées diffusible signal factors (DSF) (Fouhy, *et al.*, 2007, Crossman, *et al.*, 2008). La synthèse et la perception de ces molécules se fait grâce à la présence d'un opéron *rpf*, identifié premièrement chez le pathogène de plante *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, phylogénétiquement proche de *S. maltophilia* (Fouhy, *et al.*, 2007). La synthèse des DSF est dépendante de la protéine RpfF, présentant des similarités de séquence avec une enoyl coA hydratase, alors que la perception implique la présence d'un système de régulation à deux composants : RpfC et RpfG, sensor kinase et régulateur, respectivement. Il a été montré que ces molécules interviennent dans le contrôle de la résistance à certains antibiotiques, dans la formation de structures type agrégat et biofilm et dans la virulence notamment en induisant la synthèse de protéases extracellulaires. Malgré des systèmes de communications impliquant différentes molécules chez les deux modèles bactériens *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*, une étude récente a montré que les DSF produits par *S. maltophilia* pouvaient influencer le comportement de *P. aeruginosa* dans un biofilm constitué par les deux espèces (Figure 18) (Ryan, *et al.*, 2008).

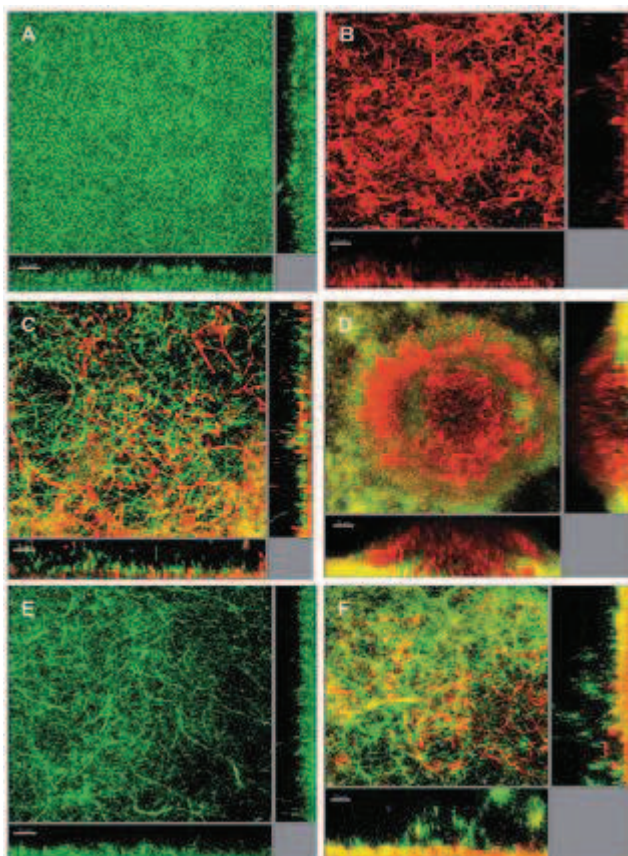


Figure 18. L'architecture du biofilm formé par *P. aeruginosa* est influencée par les molécules DSF (Diffusible Signal Factors) produites par *S. maltophilia*. A. *P. aeruginosa* PAO1, B. *S. maltophilia* K279a, C. Co-culture de PAO1 et K279a, D. Co-culture de PAO1 et K279a mutée sur un gène impliqué dans la synthèse (*arpfF*) de DSF, E. PAO1 en présence de DSF exogène (50 mM), F. Co-culture PAO1 et K279a mutée sur *arpfF* et complémentée. (Ryan *et al.*, 2008).

En effet, la présence de DSF entraîne une modification de l'architecture du biofilm constitué par *P. aeruginosa* qui forme alors des filaments étendus. La réponse de *P. aeruginosa* dépend de la présence d'une sensor kinase présentant un domaine senseur proche de celui de RpfC codée par le gène PA1396. Une mutation dans ce gène ou l'ajout de DSF entraîne une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la tolérance au stress, notamment ceux impliqués dans la résistance aux peptides antimicrobiens, entraînant une augmentation de la tolérance aux polymyxines. L'origine de ces observations est inconnue. Toutefois, les auteurs suggèrent que la protéine codée par le gène PA1396 régulerait négativement les gènes de tolérance au stress et que la liaison avec des molécules DSF pourrait en partie inverser cet effet.

III-2- Résistances

L'adaptation des bactéries à la présence de composés toxiques tels que les antibiotiques et les métaux, à la fois dans l'environnement et dans le milieu clinique permet leur survie et leur multiplication. La présence intrinsèque de nombreux mécanismes de résistance chez les bactéries pathogènes opportunistes, notamment chez *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* constitue un avantage sélectif pour ces bactéries et accroît leur capacité d'adaptation à un large panel d'environnements. De plus, leur capacité à acquérir de nouvelles résistances par mutation ou transfert horizontal favorise l'émergence de nouveaux clones, leur survie et leur dispersion lors de changements environnementaux. La résistance aux antibiotiques et aux métaux pouvant être co-sélectionnées simultanément (Figure 4) (Baker-Austin, *et al.*, 2006) à la fois dans les environnements contaminés et hospitaliers, une attention particulière sera apportée aux mécanismes permettant ces deux types de résistance.

III-2-a- Résistance aux antibiotiques

L'utilisation des antibiotiques en santé humaine est sans doute une des thérapies les plus performantes développées par l'Homme. Depuis leur découverte au milieu du 20^{ème} siècle (Figure 19), ces molécules ont permis d'éviter des millions de morts et de placer sous contrôle les nombreuses maladies infectieuses qui ont décimé la population humaine tout au long de son histoire.

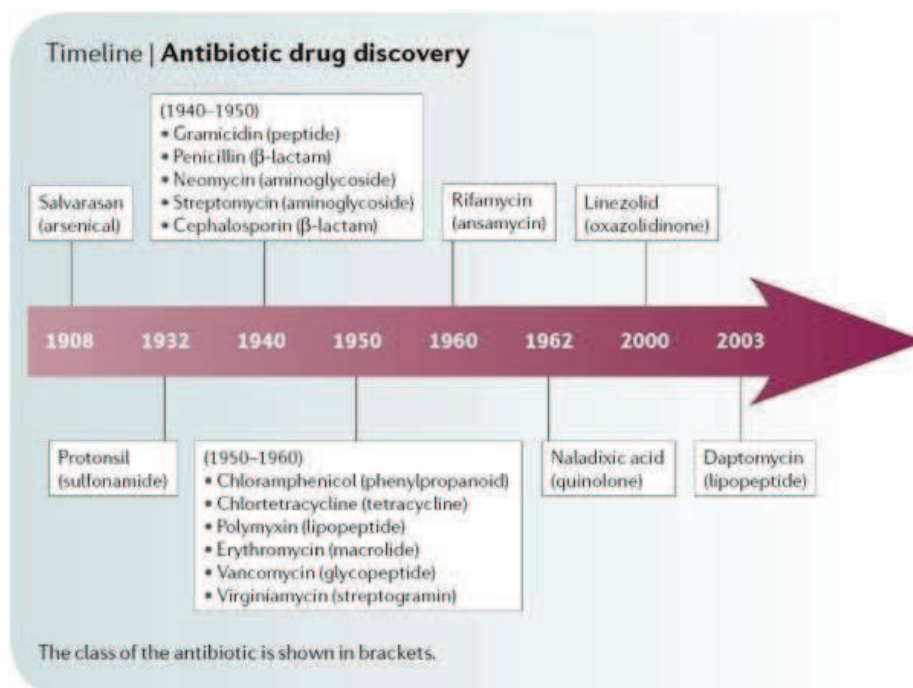


Figure 19. La découverte des antibiotiques (Wright, 2007).

Tableau 5. Classification des antibiotiques par familles de molécules (non exhaustif).

Famille d'antibiotiques	Sous-famille	Nom
β-lactamines	Pénicillines	Pénicilline G
		Oxacilline
		Ampicilline
		Ampicilline/sulbactam
		Amoxicilline
		Amoxicilline/acide clavulanique
		Mécillinam
		Ticarcilline
		Ticarcilline/acide clavulanique
		Mezlocilline
	Carbapénèmes	Imipénème
		Méropénème
		Ertapénème
		Doripénème
	Monobactame	Aztréonam
	Céphalosporines 1ère génération	Céfalotine
	Céphalosporines 2ère génération	Céfamandole
		Céfuroxime
		Céfoxitine
	Céphalosporines 3ère génération	Céfopérazone
		Céfotaxime
		Ceftizoxime
		Ceftriaxone

		Céfotétan Céfotiam Ceftazidime Cefpirome Latamoxef Cefsulodine
	Céphalosporines 4ère génération	Céfépime
Aminosides		Streptomycine Gentamicine Nétilmicine Kanamycine Tobramycine Amikacine Isépamicine Spectinomycine Néomycine
Quinolones	Quinolones de 1ère génération	Acide oxolinique Fluméquine Acide nalidixique Acide pipémidique Acide piromidique
	Quinolones de 2ème génération	Ciprofloxacine Enoxacine Lévofloxacine Loméfloxacine Moxifloxacine Norfloxacine Ofloxacine Péfloxacine Sparfloxacine
Phénicolés		Chloramphénicol Thiamphénicol
Tétracyclines		Minocycline Chlortétracycline Doxycycline Oxytétracycline
Polypeptides		Vancomycine Teicoplanine Polymyxine Bacitracin Colistine
Macrolides		Erythromycine Dirithromycine Azithromycine Spiramycine
Nitrofuranes		Nifuroxazide Nitrofurzide
Sulfamides- Triméthoprime		Sulfanilamide Sulfacetamide Sulfasalazine Triméthoprime Triméthoprime/sulfaméthoxazole

Un antibiotique est une molécule qui peut être d'origine biologique, produite par des micro-organismes (bactéries, champignons) ou de synthèse chimique. Il pourra soit inhiber la multiplication bactérienne, on parle alors d'activité bactériostatique, soit entraîner la mort de la cellule bactérienne, on parle alors d'activité bactéricide. Les antibiotiques sont classés par famille de molécules (Tableau 5) et leurs modes d'action sont variés (Figure 20). Ils vont principalement intervenir en détériorant la paroi ou la membrane cytoplasmique de la bactérie, en empêchant la synthèse des protéines ou la réplication de l'ADN.

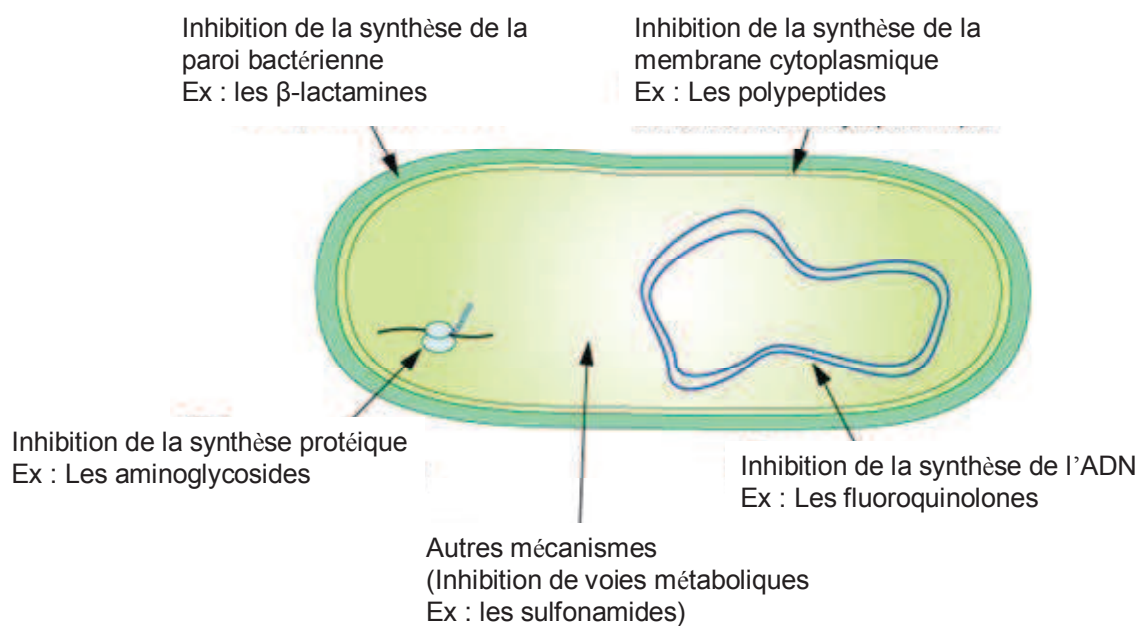


Figure 20. Modes d'action des antibiotiques.

La majorité des molécules utilisées dans le milieu clinique sont produites par des bactéries de l'environnement, en particulier par les Actinomycètes, bactéries indigènes du sol (Watve, *et al.*, 2001). Dans l'environnement, la production d'antibiotiques confère aux bactéries productrices un avantage sélectif, les rendant plus compétitives vis-à-vis des bactéries présentes dans la communauté. Ces bactéries productrices possèdent également des déterminants leur permettant de résister aux molécules qu'elles produisent. De même, la pression exercée par la présence d'antibiotiques a entraîné la sélection de mécanisme de résistance chez les bactéries de la communauté (Martinez, *et al.*, 2009). Cette résistance est

permise par quatre mécanismes généraux (Figure 21): la réduction de la perméabilité membranaire qui va permettre de réduire l'entrée des molécules, l'efflux actif des molécules grâce à des pompes à efflux, la modification de la cible ou de l'antibiotique (Levy & Marshall, 2004). Dans le milieu clinique, l'utilisation excessive et parfois inadaptée des antibiotiques a exercé le rôle de pression favorisant la sélection de résistance. Alors que l'on croyait le problème des maladies infectieuses maîtrisé, ces dernières années ont vu émerger et se répandre dans le milieu clinique des pathogènes présentant des multi-résistances aux antibiotiques, entraînant des difficultés à trouver des traitements adaptés (Slama, 2008).

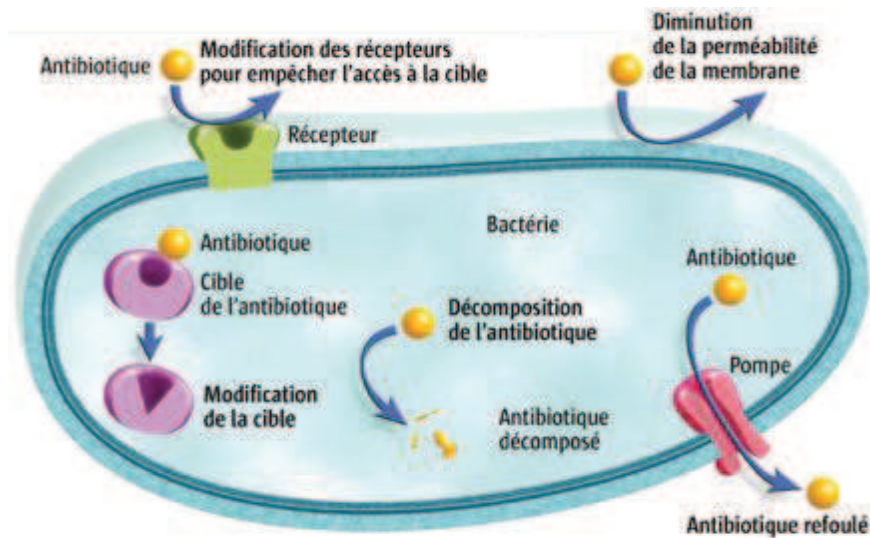


Figure 21. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.

En ce qui concerne les bactéries pathogènes opportunistes *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*, leur niveau de résistance ainsi que les mécanismes impliqués font l'objet de nombreuses études, en particulier chez les souches cliniques (tableaux 6 et 7).

Tableau 6. Bilan des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*.

Mécanisme de résistance		Nom	Résistance intrinsèque	Résistance acquise	Antibiotiques ciblés	Remarques
Réduction de la perméabilité membranaire	Réduction de l'entrée dans la cellule Efflux actif, pompes à efflux	Mutation oprD		X	Carbapénèmes	La mutation du gène codant pour la porine OprD entraîne une diminution de son expression et de l'entrée des carbapénèmes dans la cellule
		MexAB-OprM	X	X	Quinolones, macrolides, tétracyclines, lincomycine, chloramphénicol, novobiocine, β-lactamines (sauf imipénème)	Exprimée faiblement de façon constitutive, une mutation sur le régulateur entraîne une surexpression de la pompe et un niveau de résistance élevé
		MexXY-OprM	X	X	Quinolones, macrolides, tétracyclines, lincomycin, chloramphénicol, aminoglycosides, pénicillines (sauf carbénicilline and sulbénicilline), céfépime, céfpirome, méropénème	Exprimée faiblement de façon constitutive, une mutation sur le régulateur entraîne une surexpression de la pompe et un niveau de résistance élevé
		MexCD-OprJ		X	Quinolones, macrolides, tétracyclines, lincomycin, chloramphénicol, aminoglycosides, pénicillines (sauf carbénicilline and sulbénicilline), céfépime, céfpirome, méropénème	Cette pompe n'est pas exprimée de façon constitutive, une mutation sur le régulateur entraîne sa surexpression et la résistance aux antibiotiques ciblés
		MexEF-OprN		X	Quinolones, carbapénèmes	Cette pompe n'est pas exprimée de façon constitutive, une mutation sur le régulateur entraîne sa surexpression et la résistance aux antibiotiques ciblés
Inactivation enzymatique de l'antibiotique	Enzymes inactivant les β-lactamines les β-lactamases ESBL (Extended Spectrum β-lactamases)	AmpC	X		Aminopénicillines, pénicillines G, céphalosporines de 1ère et 2ème génération	Son expression peut être augmentée en présence de β-lactamines, l'activité de cette enzyme n'est pas inhibée par des inhibiteurs des β-lactamases
		ESBL de classe A		X	Carboxipénicillines, uréidopécillines, céphalosporines de 3ème et 4ème génération, aztréonam	Acquises par transfert horizontal, sensibles aux inhibiteurs des β-lactamases (acide clavulanique et tazobactame), les plus fréquemment trouvées chez <i>P. aeruginosa</i> sont les types TEM, SHV, PER, VEB, GES/IBC et BEL
	ESBL de classe D		X	Carboxipénicillines, uréidopécillines	Acquises par transfert horizontal, également nommées enzymes de types OXA, insensibles aux inhibiteurs des β-lactamases (acide clavulanique et tazobactame), (sauf OXA-18)	
	Enzymes inactivant les amino-glycosides	MBL (Metallo-β-lactamases) de classe B		X	Toutes les β-lactamines surtout carbapénèmes et à l'exception de l'aztréonam	Acquises par transfert horizontal, sensibles aux inhibiteurs des β-lactamases (acide clavulanique et tazobactame), les plus fréquemment trouvées chez <i>P. aeruginosa</i> sont les types VIM et IMP
		Aminoglycoside adenyly-transférase (AAD) ou nucléotidyl-transférases (ANT)		X	Gentamicine, tobramycine, netilmicine, amikacine*	Acquise par transfert horizontal, *dépend de l'enzyme, les plus fréquemment trouvées chez <i>P. aeruginosa</i> sont l'AAC(6')-II, l'AAC(3)-I, l'ACC(3)-II, l'AAC(6')-I
		Aminoglycoside acétyltransférase (AAC)		X	Gentamicine, tobramycine, netilmicine, amikacine*	Acquise par transfert horizontal, *dépend de l'enzyme, la plus fréquemment trouvée chez <i>P. aeruginosa</i> est l'ANT(2')-I
Modification de la cible de l'antibiotique	Modification de la topoisomérase II ou DNA gyrase Modification de la topoisomérase IV	Mutation sur les gènes <i>gyrA</i> ou <i>gyrB</i>		X	Quinolones	Ces mutations entraînent une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour l'enzyme cible
		Mutation sur les gènes <i>parC</i> ou <i>parE</i>		X	Quinolones	Ces mutations entraînent une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour l'enzyme cible
Hyper-mutation	Déficiences dans la réparation de l'ADN	Mutation sur les gènes <i>mutS</i> et <i>mutY</i>		X	Potentiellement tous les antibiotiques	Fréquent chez les souches isolées de personnes atteintes de mucoviscidose, la non-réparation de l'ADN entraîne la sélection de mutation permettant la résistance aux antibiotiques

Tableau 7. Bilan des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *S. maltophilia*.

Mécanisme de résistance		Nom	Résistance intrinsèque	Résistance acquise	Antibiotiques ciblés	Remarques
Réduction de la perméabilité membranaire	Efflux actif, pompes à efflux	SmeDEF	X	X	Tétracycline, chloramphénicol, érythromycine, norfloxacine, ofloxacine	Exprimée chez 33 % des souches, une mutation sur le répresseur entraîne une surexpression et une augmentation de la résistance aux quinolones * une mutation sur le répresseur entraîne une surexpression de la pompe et la résistance à ces antibiotiques
		SmeABC	X	X	Ciprofloxacine, * aminoglycosides, β -lactamines, quinolones	
Inactivation enzymatique de l'antibiotique	Enzymes inactivant les β -lactamines : les β -lactamases	La β -lactamase L1 (MBL)	X	X	Toutes les β -lactamines (sauf les monobactames)	Pas exprimée chez toutes les souches, insensible à l'inhibiteur des β -lactamases acide clavulanique Pas exprimée chez toutes les souches, sensibles aux inhibiteurs des β -lactamases
		La β -lactamase L2	X		Céphalosporines et monobactames	
	Enzymes inactivant les aminoglycosides	ESBL de classe A		X	Ampicilline et pipéracilline	Type TEM présente sur un transposon de la souche J6751a
		Aminoglycoside acétyltransférases (AAC)	X		Gentamycine, tobramycine	Résistance due à une AAC(6')-Iz chromosomique
Enzymes inactivant le chloramphénicol	Aminoglycoside phosphoryltransférases (APH)	X		Tous les aminoglycosides sauf la gentamicine	Résistance due à une APH(3')-IIa chromosomique	
	Acétyltransférase	X		Chloramphénicol	Résistance chromosomique	
Modification de la cible de l'antibiotique	Protection de la gyrase par le peptide Qnr	Présence du gène <i>qnr</i> codant pour le peptide SmQnr	X		Quinolones	L'association Qnr-ADN gyrase diminue l'affinité de l'enzyme pour l'antibiotique
Acquisition d'une nouvelle enzyme	Enzyme ayant moins d'affinité avec l'antibiotique	Présence du gène <i>sul1</i>		X	Triméthoprime/Sulfaméthoxazole	Acquise par transfert horizontal

P. aeruginosa et *S. maltophilia* sont intrinsèquement résistants à de nombreux antibiotiques appartenant à des familles de molécules différentes. Cette résistance est principalement due à la faible perméabilité de leur membrane, à la présence de pompes à efflux et à la production d'enzymes inactivant certains antibiotiques. Ces mécanismes sont essentiellement codés par des déterminants chromosomiques. Toutefois, ces bactéries possèdent également une grande capacité à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance par transferts horizontaux ou mutations. Ces mécanismes seront présentés dans la suite de cette partie.

Le phénotype de résistance sauvage de *P. aeruginosa* traduit toutefois une sensibilité à certains antibiotiques tels que certaines pénicillines (ticarcilline, pipéracilline...) certaines céphalosporines de 3^{ème} génération et toutes les céphalosporines de 4^{ème} génération, le monobactame aztréonam et les carbapénèmes, imipénème et méropénème (Strateva & Yordanov, 2009). Certains phénotypes de résistance sont retrouvés de façon récurrente dans le milieu hospitalier. Le premier, fréquemment appelé « résistance intrinsèque aux carbénicillines », est caractérisé par une augmentation (x 4 à x 8) de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la plupart des β -lactamines dont le méropénème (mais pas l'imipénème). Ce phénotype inclue également des résistances aux quinolones, au triméthoprime, à la tétracycline et au chloramphénicol. Ce phénotype résulte de la faible perméabilité de la membrane et de la dérégulation de systèmes d'efflux. Le deuxième phénotype est associé à une résistance à toutes les β -lactamines à l'exception des céphèmes (céfépime et cefpirome) et des carbapénèmes, résultant de la dérégulation d'une AmpC β -lactamase. Le troisième phénotype est associé à la résistance aux pénicillines (ticarcilline, azlocilline et pipéracilline ainsi qu'aux céphalosporines liée à la production d'une OXA β -lactamase (β -lactamase de spectre étendue ou ESBL). Enfin, le quatrième phénotype est associé à l'augmentation de la CMI des carbapénèmes, suite à une diminution du nombre de porines OprD. La thérapie la plus fréquemment utilisée pour traiter une infection à *P. aeruginosa* est constituée d'une association entre une β -lactamine (pénicilline, céphalosporine ou carbapénème) et un aminoglycoside ou une quinolone (de préférence la ciprofloxacine). Ces antibiotiques agissent de façon synergique et leur utilisation simultanée permet de réduire la durée du traitement.

En ce qui concerne *S. maltophilia*, sa résistance intrinsèque à la plupart des antibiotiques fréquemment utilisés en milieu clinique diminue le champ de possibilités pour le traitement des infections (Nicodemo & Paez, 2007). Ainsi, l'association triméthoprime et sulfaméthoxazole est à ce jour la thérapie la plus efficace et la plus utilisée (Muder, 2007). Quarante pourcent des souches sont sensibles à cette association, toutefois ces dernières

années ont vu émerger de plus en plus de souches résistantes. Du fait de son importante résistance intrinsèque, les aminoglycosides sont inefficaces, de même que la plupart des β -lactamines (carbapénèmes, céphalosporines...). Toutefois, l'utilisation d'inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique peut augmenter la sensibilité de *S. maltophilia*. Ainsi, la ticarcilline associée à l'acide clavulanique a montré une bonne efficacité et peut être utilisée lorsque le traitement triméthoprim/sulfaméthoxazole est inefficace. Par contre, d'autres associations telles que la ticarcilline/ampicilline + le sulbactam ou ceftazidime/céfépime + acide clavulanique n'ont pas montré une bonne efficacité. Les nouvelles quinolones (levofloxacine, clinafloxacine...) et les polypeptides (polymixine et colistine) ont montré une bonne efficacité in vitro avec 95 % et 75 % de souches testées sensibles, respectivement, mais sont peu utilisés du fait du manque d'études cliniques et de leur potentiel effet toxique (pour la polymixine).

- Résistance due à la réduction de la perméabilité membranaire

La résistance aux antibiotiques du fait de la réduction de la perméabilité membranaire de *P. aeruginosa* résulte de deux types de phénomènes : d'une part, la réduction de l'entrée des antibiotiques et d'autre part l'efflux actif des molécules entrées dans la cellule. Notamment, la plupart des souches résistantes à l'imipénème sont caractérisées par une réduction du nombre de porines OprD, formant un pont permettant l'entrée dans la cellule des carbapénèmes (Pirnay, *et al.*, 2002). Une mutation sur le gène *oprD* est à l'origine de cette réduction et limite ainsi l'entrée des carbapénèmes.

L'efflux actif contribue également à la multi-résistance de *P. aeruginosa*. Ce mécanisme de résistance est généralement considéré comme conférant une résistance aux antibiotiques faible à modérée mais il joue un rôle majeur chez les isolats cliniques pour trois raisons (Mesaros, *et al.*, 2007). Tout d'abord, il limite le choix du traitement antibiotique du fait que les systèmes impliqués sont souvent généralistes. Ensuite, il peut agir en complément d'autres mécanismes, entraînant un niveau plus élevé de résistance. Enfin, il peut favoriser la sélection de mutations en diminuant la concentration en antibiotiques dans la cellule bactérienne.

P. aeruginosa possède quatre systèmes à trois composants impliqués dans l'efflux d'antibiotiques. Ces systèmes appartiennent à la famille RND (Resistance Nodulation Division) et sont nommés : MexA–MexB–OprM, MexC–MexD–OprJ, MexE–MexF–OprN et MexX–MexY–OprM. Ces pompes à efflux sont constituées d'une protéine située dans la membrane cytoplasmique ((MexB, MexD, MexF et MexY) agissant comme une pompe dont

l'activité dépend de la production d'énergie (force protons motrice) et possédant une spécificité de substrat large. Le deuxième composant est une protéine située dans la membrane externe (OprM, OprJ, OprN et OprM) et le troisième est localisée dans l'espace périplasmique et lie les deux autres composants (MexA, MexC, MexE et MexX) (Livermore, 2002). MexA–MexB–OprM et MexX–MexY–OprM participent à la fois à la résistance intrinsèque et à la résistance acquise de *P. aeruginosa* alors que MexC–MexD–OprJ et MexE–MexF–OprN ne participe qu'à la résistance acquise (Tableaux 8, 9 et 10) (Poole & Srikumar, 2001).

Tableau 8. Substrats des pompes à efflux présentes chez *P. aeruginosa* (Strateva & Yordanov, 2009).

Cytoplasmic membrane pump	Periplasmic linker	Outer membrane channel	Substrate
MexB	MexA	OprM	Quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, chloramphenicol, novobiocin, β -lactams except imipenem
MexD	MexC	OprJ	Quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, chloramphenicol, novobiocin, penicillins except carbenicillin and sulbenicillin, cefepime, ceftazidime, meropenem
MexF	MexE	OprN	Fluoroquinolones, carbapenems
MexY	MexX	OprM	Quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, chloramphenicol, aminoglycosides, penicillins except carbenicillin and sulbenicillin, cefepime, ceftazidime, meropenem

Tableau 9. Impact des mutations sur les gènes codant pour les pompes à efflux sur les résistances aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* (Strateva & Yordanov, 2009).

Overexpression of:	Mutation site	Impact on resistance to antimicrobial agents with antipseudomonal activity											
		Fq	CAR	TIC	PIP	AZL	CAZ	ATM	FEP	CPO	IMP	MEM	Agl
MexA–MexB–OprM	<i>mexR</i> ; PA3721 and PA3719; PA3574	r/R	R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	-	r	-	-
MexC–MexD–OprJ	<i>gfpB</i>	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	-	r	-	r	-	-
MexE–MexF–OprN	<i>mexT</i>	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r	r	r	-	-
MexX–MexY–OprM	<i>mexZ</i>	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	-	r	r/R	-

Agl, Aminoglycosides; ATM, aztreonam; AZL, azlocillin; CAR, carbenicillin; CAZ, ceftazidime; CPO, ceftazidime; FEP, cefepime; Fq, fluoroquinolones; IMP, imipenem; MEM, meropenem; PB, polymyxin B; PIP, piperacillin; r, reduced susceptibility; R, resistance; TIC, ticarcillin.

Tableau 10. Mécanismes de résistances acquises chez *P. aeruginosa* (Rossolini & Mantengoli, 2005).

Resistance mechanism	Affected anti-pseudomonal agents
Acquired by mutation	
AmpC derepression	Penicillins, cepheims, monobactams ^a
OprD loss	Carbapenems
Up-regulation of efflux pumps	
MexA–MexB–OprM	All β-lactams except imipenem Fluoroquinolones
MexC–MexD–OprJ	Some β-lactams (cefoperazone, ceftirome, ceftipime, meropenem) Fluoroquinolones
MexE–MexF–OprN	Fluoroquinolones (Carbapenems) ^b
MexX–MexY–OprM	Some β-lactams (cefoperazone ceftirome, ceftipime, meropenem) Fluoroquinolones Aminoglycosides
GyrA and/or ParC modification	Fluoroquinolones
Membrane changes	Polymyxins, aminoglycosides
Acquired following transfer of exogenous resistance genes	
β-Lactamases	
Narrow-spectrum molecular class A (e.g., PSE-1, PSE-4, TEM-1) and class D (e.g., OXA-3) enzymes	Penicillins, cefoperazone
Extended-spectrum molecular class A (e.g., PER-1, VEB-1, GES-1, GES-2, TEM-12, SHV-5) and class D (e.g., OXA-11, OXA-14, OXA-18, OXA-28) enzymes	Penicillins, cepheims, monobactams ^a
Molecular class B metallo-enzymes (IMP-, VIM-, SPM- and GIM-type enzymes)	All β-lactams except monobactams
Aminoglycoside-modifying enzymes ^d	
AAC(3)-I	Gentamicin
AAC(3)-II	Gentamicin, tobramycin, netilmicin
AAC(6)-I	Tobramycin, netilmicin, amikacin
AAC(6)-II	Gentamicin, tobramycin, netilmicin
ANT(2’)-I	Gentamicin, tobramycin

MexA–MexB–OprM est naturellement exprimé à un faible niveau. Une mutation sur le gène *mexR* codant pour une protéine qui réprime l’expression de cette pompe peut entraîner sa surexpression. Les souches mutées sur ce gène présentent une résistance à la plupart des β-lactamines (pénicillines, céphalosporines, monobactames, méropénème mais pas imipénème) (Livermore, 2001). La pompe MexC–MexD–OprJ, quand à elle, n’est pas exprimée de façon constitutive et est surexprimée suite à une mutation sur le gène codant pour le répresseur NfxB (Poole, *et al.*, 1996). Cette pompe est alors à l’origine de l’efflux des céphèmes (β-lactamines), des quinolones, des macrolides, de la tetracycline et du chloramphénicol. En ce qui concerne la pompe MexE–MexF–OprN, impliquée principalement dans l’efflux des quinolones, du chloramphénicol et du triméthoprim, une mutation sur le gène codant pour le régulateur MexT entraîne une surexpression de la pompe corrélée à une augmentation de la résistance aux carbapénèmes (Kohler, *et al.*, 1999). Enfin, la pompe MexX–MexY–OprM est à l’origine de l’efflux des aminoglycosides, de la tetracycline et de l’érythromycine (Masuda,

et al., 2000). Une mutation sur le gène codant pour le répresseur MexZ entraîne une surproduction de la pompe, augmentant la résistance aux aminoglycosides et fluoroquinolones (Mao, *et al.*, 2001).

Plusieurs pompes à efflux ont été mises en évidence chez *S. maltophilia*. Ces pompes sont également constituées d'une protéine membranaire, d'un transporteur énergie-dépendant et d'une protéine située dans la membrane externe. Notamment, la pompe SmeDEF participe à la résistance à la tétracycline, au chloramphénicol, à l'érythromycine, à la norfloxacine et à l'ofloxacine et est exprimée chez 33 % des souches (Alonso & Martinez, 2001). Une surexpression de cette pompe suite notamment à une mutation sur le gène codant pour le répresseur SmeT augmente la résistance aux quinolones (Sanchez, *et al.*, 2004). La pompe SmeABC, quant à elle, est responsable de la résistance la ciprofloxacine (Chang, *et al.*, 2004). Une surexpression de cette pompe, suite à la perte du répresseur SmeR, serait à l'origine d'une résistance accrue aux aminoglycosides, aux β -lactamines et aux quinolones (Li, *et al.*, 2002). Une délétion de *smeC* mais pas *smeD* supprime cette résistance, suggérant que *smeC* serait impliqué dans la résistance indépendamment de *smeAB*. L'expression de ce gène serait corrélée à l'activité de la β -lactamase L2, responsable de l'augmentation de la résistance aux β -lactamines observées chez les souches hyperproductrices de la pompe SmeABC. Toutefois, les mécanismes permettant cette co-régulation restent inconnus à ce jour. Le séquençage du génome de *S. maltophilia* a mis en évidence un grand nombre de pompes à efflux mais leur implication dans la résistance n'est pas encore connue (Crossman, *et al.*, 2008).

- Résistance due à l'inactivation enzymatique de l'antibiotique

La présence d'enzymes inactivant les antibiotiques va être impliquée dans la résistance aux β -lactamines et aux aminoglycosides chez *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. *P. aeruginosa* possède une AmpC β -lactamase chromosomique (ou céphalosporinase) permettant notamment la résistance à la pénicilline G et aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération (Bagge, *et al.*, 2002). Parmi les différentes familles de β -lactamases, les ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase), notamment les métallob- β -lactamases (MBL ou carbapénèmases) se sont répandues chez les souches cliniques de *P. aeruginosa* ces dernières années (Tableau 8). Ces enzymes confèrent la résistance à toutes les β -lactamines à l'exception des carbapénèmes et des monobactames, respectivement. Différentes classes d'ESBLs ont été retrouvées chez différentes souches de *P. aeruginosa*. Les ESBL de classe A sont à l'origine de résistance à certaines pénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréonam (Weldhagen, *et al.*, 2003). Ces enzymes sont inhibées par l'acide clavulanique et le tazobactam (Nordmann &

Guibert, 1998). Différents types d'ESBL de classe A sont connues et les plus fréquemment retrouvées chez *P. aeruginosa* sont les types TEM, SHV mais également PER, VEB, GES/IBC et BEL (Strateva & Yordanov, 2009). Malgré une faible identité de séquences nucléotidiques entre ces enzymes, leur profil hydrolytique est semblable. Les ESBL de classe D ou oxacillinases (enzymes de type OXA) permettent également la résistance à certaines pénicillines mais pas à la ceftazidime (Bert, *et al.*, 2002). De plus, leur activité n'est pas supprimée par les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam). Enfin, les ESBL de classe B ou métallo- β -lactamases du fait de la présence de Zn^{2+} dans leur centre actif (MBL ou carbapénèmases) sont à l'origine de la résistance à toutes les β -lactamines, en particulier les carbapénèmes et à l'exception de l'aztréonam. Ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam, mais par des chélateurs ioniques divalents (Nordmann & Poirel, 2002). Les MBL de types VIM et IMP sont les plus fréquemment rencontrées chez *P. aeruginosa* alors que la présence des types SPM et GIM n'a été rapportée qu'occasionnellement (Strateva & Yordanov, 2009). Les ESBL sont souvent retrouvées dans des zones géographiques particulières. Notamment, des souches de *P. aeruginosa* portant des MBL sont fréquemment isolées en Asie mais des épidémies ont été décrites en Europe (Aubron, *et al.*, 2005, Walsh, 2005). De plus, les gènes codant pour ces enzymes sont généralement présents sur des éléments génétiques mobiles, de type plasmides ou intégrons, pouvant porter d'autres gènes de résistance. L'acquisition de tels éléments mobiles, sélectionnés sous la pression antibiotique, participe à la multi-résistance de *P. aeruginosa*.

S. maltophilia quant à elle possède deux β -lactamases chromosomiques inductibles appelées L1 et L2. Ces enzymes ne sont toutefois pas exprimées chez toutes les souches cliniques même après induction par une β -lactamine. L'enzyme L1 est une métallo- β -lactamase dépendante de la présence de Zn^{2+} , virtuellement capable d'hydrolyser toutes les β -lactamines, notamment les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes mais pas les monobactames (Crowder, *et al.*, 1998). De plus, cette enzyme n'est pas inhibée par l'utilisation d'acide clavulanique comme inhibiteur des β -lactamases. L'enzyme L2 est une céphalosporinase qui hydrolyse l'aztréonam (Walsh, *et al.*, 1997). Son activité est inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs des β -lactamases. *S. maltophilia* serait également capable d'acquérir des gènes par transfert horizontal, comme le montre la présence d'un gène codant pour une β -lactamase de type TEM sur un transposon chez une souche clinique (Avison, *et al.*, 2000).

Les enzymes inactivant les aminoglycosides ou AME (Aminoglycoside Modifying Enzymes) sont retrouvées dans 20 % des isolats cliniques de *P. aeruginosa* d'Europe et d'Amérique de Sud (Poole, 2005). Ces enzymes se lient aux radicaux phosphate, adényl ou acétyl de la

molécule antibiotique, ce qui diminue l'affinité de liaison de l'antibiotique modifié à sa cible dans la cellule bactérienne (sous-unité 30S du ribosome). Ces enzymes sont portées par des éléments génétiques mobiles (type plasmides, intégrons, transposons...) et se divisent en trois classes : les aminoglycoside phosphoryltransférases (APH), les aminoglycoside adenylyltransférases (AAD) ou nucléotidyltransférases (ANT) et les aminoglycoside acétyltransférases (AAC) (Vakulenko & Mobashery, 2003). Les plus fréquemment exprimées chez *P. aeruginosa* sont l'AAC(6')-II permettant la résistance à la gentamicine, la tobramycine et la netilmicine, l'AAC(3)-I permettant la résistance à la gentamicine, l'ACC(3)-II à l'origine de la résistance à la gentamicine, la tobramycine et la netilmicine, l'AAC(6')-I à l'origine de la résistance à la tobramycine, la netilmicine et l'amikacine et l'ANT(2')-I permettant la résistance à la gentamicine et la tobramycine (Miller, *et al.*, 1997). Différentes enzymes sont également retrouvées chez *S. maltophilia*, notamment l'AAC(6')-Iz permettant la résistance à la gentamicine et à la tobramycine (Li, *et al.*, 2003), l'APH(3')-IIa à l'origine de la résistance à tous les aminoglycosides à l'exception de la gentamicine (Okazaki & Avison, 2007). Le gène codant pour une acétyltransférase, potentiellement à l'origine de la résistance au chloramphénicol, a été mis en évidence lors du séquençage de la souche K279a (Crossman, *et al.*, 2008).

- Résistance due la modification de la cible

La modification de la cible de l'antibiotique est un mécanisme fréquemment impliqué dans la résistance aux fluoroquinolones. Ces antibiotiques inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe « ADN-ADN gyrase » en empêchant la réplication et la transcription du génome bactérien (Hooper, 2000). Chez *P. aeruginosa*, la modification de la cible préférentielle de ces antibiotiques, la DNA gyrase, aussi appelée topoisomérase II, résulte de mutations ponctuelles sur les gènes *gyrA* et *gyrB* dans le motif QRDR (Quinolone Resistant Determinative Region), considéré comme le site actif de l'enzyme (Mouneimne, *et al.*, 1999). De ce fait, les séquences en acides aminés des sous unités A et B sont altérées, ce qui conduit à la synthèse d'une topoisomérase II présentant une faible affinité pour les molécules de quinolones. Des modifications de la deuxième cible des quinolones : la topoisomérase IV peuvent se produire également suite à des mutations ponctuelles dans les gènes *parC* et *parE* codant pour les sous-unités ParC et ParE de l'enzyme (Lee, *et al.*, 2005). Chez *S. maltophilia*, la résistance aux quinolones n'implique pas la modification de l'enzyme. Cette bactérie possède un gène *qnr* chromosomique codant pour un peptide nommé SmQnr qui va se lier à la gyrase pour la protéger contre les quinolones. L'association Qnr-ADN

gyrase diminue ainsi l'affinité de l'enzyme pour l'antibiotique. Ce phénomène de résistance est d'autant plus important que la quantité de SmQnr est importante, suggérant que l'hyperproduction de ce peptide pourrait jouer un rôle principal dans la résistance (Sanchez & Martinez, 2009).

- Résistance due à l'acquisition d'une nouvelle enzyme

La production d'une nouvelle enzyme pour améliorer l'affinité entre l'enzyme et le substrat modifié par un antibiotique est un mécanisme que l'on retrouve chez *S. maltophilia*. En effet, la résistance au triméthoprim associé au sulfaméthoxazole peut être due à l'acquisition d'un intégron de classe 1 portant le gène *sull* (Barbolla, *et al.*, 2004, Toleman, *et al.*, 2007). Cette association d'antibiotiques a pour cible la voie de synthèse des acides nucléiques. En particulier, le sulfaméthoxazole est responsable de la modification du substrat, entraînant une diminution de l'affinité pour l'une des enzymes impliquées. Le gène *sull* code pour une nouvelle enzyme ayant moins d'affinité pour le substrat, ce qui permet une meilleure liaison avec le substrat modifié. Même si l'acquisition de tels éléments mobiles est rare et qu'actuellement plus de 80 % des souches isolées du milieu clinique sont sensibles à ces antibiotiques, elle est en constante augmentation depuis sa mise en évidence (Barbolla, *et al.*, 2004). Une telle acquisition pose un réel problème dans le traitement des infections à *S. maltophilia* du fait que cette association d'antibiotiques est à ce jour la thérapie privilégiée.

- Phénotype hypermutable des souches de *P. aeruginosa*

On observe chez les souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose des phénotypes de multi-résistance aux antibiotiques suite à des mutations. Ces souches sont qualifiées d'hypermutables. Elles sont présentes dans 37 % des patients atteints de mucoviscidose et représentent 20 % des isolats de ces patients. Ce phénotype est lié à une mutation sur les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN *mutS* et *mutY* (Oliver, *et al.*, 2000). Les mécanismes de réparation sont alors déficients et la pression antibiotique élevée chez ces patients sélectionne des souches résistantes à tous les antibiotiques potentiellement utilisables contre *P. aeruginosa*. En effet, comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, des mutations ponctuelles peuvent être à l'origine d'une augmentation de la résistance aux β -lactamines, aminoglycosides ou encore fluoroquinolones.

III-2-b- Résistance aux métaux (ou éléments trace métalliques)

Les métaux sont naturellement présents dans l'environnement et largement distribués sur la planète. La présence de métaux dans les sols résulte de processus naturels et est notamment liée à l'évolution de la roche mère contenant initialement des métaux. Certaines activités humaines, agricoles ou industrielles, contribuent à mobiliser ces métaux modifiant leur teneur et spéciation dans l'environnement. Les sources de contamination par l'Homme sont diverses : apports par épandage de boues de stations d'épuration, apports d'engrais, de produits phytosanitaires, de lisiers, de composts urbains, irrigation avec des eaux résiduelles agro-industrielles, rejets atmosphériques (poussières et aérosols) à proximité d'axes routiers ou de sites industriels anciens, ou encore apports massifs suite à des accidents ponctuels ou encore des transferts latéraux par ruissellement en bordure de route.

Certains de ces métaux, comme le zinc ou le cuivre, sont indispensables aux processus biologiques et deviennent toxiques à partir d'une concentration seuil alors que d'autres sont toxiques même à faible concentration (cas du mercure et du cadmium). Différents paramètres influencent la biodisponibilité des métaux dans les sols et donc leur toxicité. Parmi ces paramètres, le pH joue un rôle essentiel dans la solubilité des métaux. Ainsi, un pH acide entraîne une solubilisation des métaux, les rendant plus disponibles et donc potentiellement plus toxiques. La composition du sol est également impliquée. L'argile et la matière organique adsorbent les éléments et les séquestrent sous forme de complexes stables faiblement mobiles alors que les particules plus grossières comme le sable ou le gravier retiennent moins les métaux, augmentant leur biodisponibilité.

Les bactéries ont été soumises à la présence de métaux depuis leur émergence sur Terre. Il est de ce fait peu probable que les mécanismes à l'origine de résistance aient été sélectionnés suite à des pollutions anthropiques récentes mais qu'elles soient plutôt apparues au cours de leur évolution suite à une pression métallique naturelle (Silver & Phung le, 2005). Plusieurs mécanismes généraux ont été mis en évidence tels que la réduction de la perméabilité membranaire par l'efflux actif nécessitant la présence de pompes à efflux, la séquestration du métal ou la modification de la forme chimique du métal. De la même façon que pour les résistances aux antibiotiques, les déterminants génétiques à l'origine des résistances aux métaux lourds peuvent être portés par le chromosome entraînant une résistance intrinsèque ou bien par un élément génétique mobile entraînant une résistance acquise.

Bien que *S. maltophilia* et *P. aeruginosa* aient été fréquemment isolées d'environnements contaminés en métaux, peu d'études sont menées afin d'identifier les mécanismes impliqués dans la résistance.

Chez *P. aeruginosa*, plusieurs mécanismes de résistance aux métaux ont été décrits. Notamment, Hassan et collaborateurs ont mis en évidence l'implication de la pompe à efflux CzcCBA dans la résistance au cadmium, zinc et cobalt chez *P. aeruginosa* (Hassan, *et al.*, 1999). Malgré une position chromosomique des gènes impliqués, toutes les souches de *P. aeruginosa* ne semblent pas capables de tolérer les mêmes concentrations en métaux. Les auteurs de cette étude ont alors émis l'hypothèse de variations au niveau de la régulation des gènes codant pour la pompe à efflux. L'effet de la présence du cuivre sur l'expression des gènes de *P. aeruginosa* a été récemment évalué (Teitzel, *et al.*, 2006). Cette étude a mis en évidence l'importance des pompes à efflux dans la tolérance au cuivre, notamment de la pompe CzcCBA, d'une protéine de liaison au cuivre homologue à celle codée par les gènes *copAB* chez *P. syringae*, d'une putative cuivre oxidase codée par les gènes *cpoAB* et d'un système de régulation à deux composants nommé CopR/CopS présentant une homologie au système également présent chez *P. syringae*, impliqué chez cette espèce dans la régulation des gènes *copAB* et *cpoAB*. En ce qui concerne la résistance au mercure, elle est permise par un mécanisme enzymatique permettant de réduire le Hg^{2+} en Hg^0 volatile. Cette réduction est possible grâce à la mercurique réductase codée par le gène *merA*, présent dans l'opéron *merRTPA*, codant pour des protéines de transport (*merT* et *merP*) et un régulateur (*merR*). Ces gènes sont fréquemment retrouvés sur des éléments génétiques mobiles, notamment sur des îlots génomiques chez *P. aeruginosa*. Au sein des génomes séquencés, on remarque que l'opéron *mer* est présent chez PA14 avec une homologie de 99 % avec l'opéron présent sur le transposon Tn501. Le génome de PA7 quant à lui contient 3 opérons *mer* dont un homologue à celui du Tn501, un homologue à celui de l'îlot génomique PAGI-5 et un partiel homologue à celui trouvé chez *P. stutzeri*. Enfin, le génome de LESB58 contient un opéron *mer* homologue à celui présent sur l'îlot génomique PAGI-2. Des études ont également mis en évidence la présence de plasmides portant l'opéron *mer* chez certaines souches de *P. aeruginosa* (Clark, *et al.*, 1977).

En ce qui concerne *S. maltophilia*, une étude menée sur la souche sm777 présentant des multi-résistances aux métaux a mis en évidence certains mécanismes impliqués dans la résistance au sélénite, tellurite et cadmium (Pages, *et al.*, 2008). Chez cette souche, la résistance au sélénite et au tellurite serait due à la transformation en Se^0 et Te^0 et à leur accumulation dans des granules et sous forme de cristaux, respectivement. La résistance au cadmium, quant à elle,

serait due à la chélation du cadmium et à son accumulation sous forme non toxique. Le séquençage des génomes a mis en évidence plusieurs opérons potentiellement impliqués dans la résistance aux métaux tels que les opérons *mer*, potentiellement impliqué dans la résistance au mercure, *cop* potentiellement impliqué dans la résistance au cuivre, ou encore *czc* potentiellement impliqué dans la résistance au zinc, cadmium et cobalt. Toutefois, des études sont nécessaires afin de corréler la présence de ces gènes et les capacités de tolérance aux métaux (Rocco, *et al.*, 2009).

III-2-c- Co-sélection de résistance aux antibiotiques et aux métaux

Des phénomènes de co-sélection de résistance aux antibiotiques et aux métaux ont été mis en évidence chez nos deux modèles. Notamment, Alonso et collaborateurs ont mis en évidence chez une souche de *S. maltophilia* d'origine clinique isolée de l'expectoration d'une personne atteinte de mucoviscidose, la présence d'un groupe de gènes potentiellement impliqués dans la résistance à l'érythromycine et au cadmium (Alonso, *et al.*, 2000). Cette région présente des homologies de séquence importantes avec une région présente sur un plasmide de *Staphylococcus aureus*, bactérie à gram positif, suggérant une acquisition secondaire de cette région (Tenover, *et al.*, 1994). De plus, le pourcentage en GC, très différent de celui du reste du génome de *S. maltophilia* (35,1 % au lieu d'environ 65 %) est également en faveur d'une acquisition secondaire de ce fragment. Des échanges de gènes entre bactéries Gram négatif et Gram positif ont déjà été mis en évidence et nécessitent que les bactéries partagent la même niche écologique. Dans le cas de *S. maltophilia* et *S. aureus*, de telles situations sont observables dans le cas de co-infection, en particulier lors d'infections chroniques telles que celles observées chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Harrison, 2007). Il n'est pas à exclure que ce type d'échange puisse également avoir lieu dans l'environnement entre *S. maltophilia* et des bactéries Gram positif partageant la même niche telles que *Bacillus* spp..

Un phénomène de co-régulation a récemment été décrit chez *P. aeruginosa*. Il a tout d'abord été mis en évidence que la présence de zinc dans les éluats de cathéter urinaire en latex siliconé entraînait une augmentation de la résistance aux carbapénèmes liée à la répression de la porine OprD, qui permet l'entrée de l'antibiotique dans la cellule bactérienne (Conejo, *et al.*, 2003). L'implication du système de régulation à deux composants CzcR/CzcS dans ce phénomène a ensuite été décrite. En effet, en présence de zinc (ou de cadmium), ce système

augmente l'expression de la pompe à efflux CzcCBA à l'origine de l'efflux du zinc, cadmium et cobalt et va également réprimer l'expression de la porine OprD, diminuant l'entrée de l'imipénème dans la bactérie (Perron, *et al.*, 2004). De plus, une mutation sur le gène *czcS*, sélectionnée suite à une exposition à une forte concentration de zinc (20 mM), peut entraîner une activité continue du système de régulation qui réprime de façon permanente l'expression de la porine OprD et entraîne de ce fait une résistance permanente aux carbapénèmes.

Il a également été montré que la présence de cuivre avait le même effet sur la résistance à l'imipénème (Caille, *et al.*, 2007). Ce phénomène implique un deuxième système de régulation à deux composants appelé CopR/CopS qui va induire l'expression de la pompe à efflux permettant la résistance au cuivre et va également réprimer l'expression de la porine OprD. L'induction de ce système permettrait également la résistance au zinc et cadmium en activant le système CzcR/CzcS. Ces observations sont très importantes d'un point de vue clinique car l'imipénème est fréquemment utilisé comme antibiotique de dernier recours contre les infections à *P. aeruginosa*. L'utilisation de ce type de traitement chez les personnes développant une infection urinaire à *P. aeruginosa* nécessitant la mise en place d'un cathéter risque donc d'avoir un effet limité.

Conclusion

Ainsi, cette revue bibliographique se rapportant aux deux bactéries pathogènes opportunistes *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* a permis de mettre en évidence la complémentarité de ces deux modèles dans mon étude. Tout d'abord, nous avons pu constater que ces bactéries étaient largement répandues dans l'environnement et de nombreuses études ont rapporté leur présence dans une grande variété d'environnements. Ces deux modèles sont retrouvés à la fois dans des environnements naturels et des environnements fortement anthropisés. Toutefois, leur prévalence dans de tels écosystèmes est souvent inconnue. En particulier, un manque d'informations concernant la quantité et la diversité des isolats des deux modèles présents dans les sols ainsi que l'aptitude de *P. aeruginosa* à y survivre, a été mis en évidence dans la première partie de ce chapitre.

L'implication en santé humaine de ces bactéries pathogènes opportunistes a également fait l'objet de nombreuses études. Elles sont responsables d'infections chez des personnes fragilisées dont les défenses immunitaires sont altérées et entraînent des pathologies aux

symptômes variés en fonction de la localisation de l'infection. Leur présence dans l'environnement hospitalier cause un réel problème de santé publique et les moyens mis en œuvre pour réduire leur dispersion n'ont qu'un effet limité.

La réussite de l'interaction avec l'hôte résulte notamment de l'aptitude de ces deux modèles à être mobiles, à adhérer aux cellules de l'hôte, à échapper à son système immunitaire, à former des biofilms, à communiquer par quorum sensing et également à résister aux antibiotiques. Toutes ces capacités pourraient également intervenir dans la grande capacité de ces bactéries à survivre dans une grande variété d'environnements. Toutefois, peu d'études sont menées dans un but de mieux appréhender le rôle de ces fonctions dans l'environnement, notamment en ce qui concerne les capacités de résistance aux antibiotiques de ces deux modèles bactériens. Pourtant, la présence de déterminants génétiques impliqués dans la résistance aux antibiotiques dans l'environnement a été rapportée. Il est donc essentiel d'évaluer la capacité de résistance des isolats environnementaux ainsi que la prévalence de ces souches dans les populations indigènes et de comparer les comportements de ces souches par rapport aux souches d'origine clinique. Il semble également nécessaire de mettre en évidence les paramètres qui favorisent la présence de souches résistantes et les déterminants impliqués dans ces résistances, tels que les contaminations métalliques qui pourraient être à l'origine de l'émergence et du maintien de résistance aux antibiotiques par des phénomènes de co-sélection de résistance aux métaux et aux antibiotiques.

PARTIE II : Partie Expérimentale

PART II : Experimental part

Chapitre 1 : Distribution des modèles *Pseudomonas aeruginosa* et *Stenotrophomonas maltophilia* dans les sols, effets de l'anthropisation sur leur présence et leur abondance

Chapter 1: *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* distribution in soils, effects of anthropization on their presence and abundance

Introduction

P. aeruginosa et *S. maltophilia* sont des bactéries Gram négatif de la classe des γ -protéobactéries fréquemment qualifiées d'ubiquistes et présentant des capacités d'adaptation à un grand nombre d'environnements terrestres et aquatiques naturels, anthropisés ou créés par l'Homme. Toutefois, ces bactéries sont surtout connues pour leur fréquente implication dans des infections nosocomiales faisant de ces espèces des pathogènes opportunistes d'importance majeure en santé publique (Berthelot, *et al.*, 2005). Nous avons pu constater tout au long de la revue bibliographique présentée dans le premier chapitre de cette thèse que ces modèles font l'objet de nombreuses études dans le milieu clinique. Ces bactéries sont impliquées dans une grande variété d'infections chez les personnes dont les barrières immunitaires sont fragilisées (personnes immunodéprimées, brûlées, diabétiques...) (Mesaros, *et al.*, 2007). Elles sont également capables de coloniser les poumons des personnes atteintes de mucoviscidose et peuvent créer des dommages irréversibles dans les tissus (Foweraker, 2009). Dans ce contexte, de nombreuses études sont menées dans le but d'évaluer la prévalence, la distribution et la diversité de ces bactéries dans l'environnement hospitalier afin de mettre en évidence l'origine des infections. Des réservoirs potentiels pouvant être à l'origine de la transmission aux patients, tels que le matériel médical (cathéter, appareil respiratoire, sondes...) ou le réseau d'eau (robinet, lavabo, douche...) ont été mis en évidence (Denton & Kerr, 1998, Trautmann, *et al.*, 2005). Les études de diversité menées sur les souches hospitalières montrent généralement une grande diversité, certains clones présentant des capacités plus importantes à coloniser de façon durable le milieu hospitalier et pouvant être responsables d'infections (Lavenir, *et al.*, 2008). Les mécanismes impliqués dans la réussite de l'interaction avec l'hôte sont largement investigués chez les isolats responsables d'infections. Les facteurs de virulence tels que les capacités d'adhésion (Feldman, *et al.*, 1998, de Oliveira-Garcia, *et al.*, 2003), la formation de biofilms (Wagner & Iglewski, 2008) ou la sécrétion de toxines entraînant des dommages chez l'hôte (Windhorst, *et al.*, 2002, Veessenmeyer, *et al.*, 2009) ainsi que les capacités de résistance aux antibiotiques et antiseptiques (Nicodemo & Paez, 2007, Strateva & Yordanov, 2009) sont essentiels à la réussite de l'infection et à leur survie et leur dispersion dans le milieu clinique. Ces capacités, en particulier celles de résister aux antibiotiques, pourraient également participer à la grande capacité d'adaptation des modèles dans l'environnement. Toutefois, l'étude des capacités de

résistance des souches environnementales de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* font l'objet de peu d'études.

Bien que leur présence ait été rapportée à de nombreuses reprises dans une grande variété d'environnements terrestres et aquatiques, peu d'informations sont actuellement disponibles sur leur distribution et leur abondance ainsi que sur les facteurs favorisant leur présence et leur dispersion dans les sols. La présence de *P. aeruginosa* en tant qu'habitant indigène du sol est d'ailleurs controversée. Les études menées sur les sols, pour la plupart relativement anciennes, sont rares et les résultats obtenus contradictoires (Ringen & Drake, 1952, Green, *et al.*, 1974). Sa capacité de survie a également été remise en question suite à l'observation de la mort rapide de souches de *P. aeruginosa* inoculées dans des microcosmes de sol (Zechman & Casida, 1982). En revanche, la présence de *S. maltophilia* a été rapportée à de nombreuses reprises dans la rhizosphère de différentes plantes (Berg, *et al.*, 1996). Toutefois, dans la majorité des cas, l'abondance et les facteurs favorisant sa présence et sa distribution sont inconnus. Différentes études ont montré la présence de ces modèles dans des environnements terrestres et aquatiques fortement anthropisés, ayant subi des contaminations en hydrocarbures (Cavalca, *et al.*, 2000, Hawle-Ambrosch, *et al.*, 2007) ou en métaux lourds (Matyar, *et al.*, 2008, Matyar, *et al.*, 2009). De plus, les isolats présents dans de tels environnements sont généralement capables de résister à un spectre de molécules plus large incluant les antibiotiques (Filali, *et al.*, 2000, Matyar, *et al.*, 2008).

Les sols peuvent être considérés comme un réservoir de déterminants génétiques impliqués dans la résistance aux antibiotiques (D'Costa, *et al.*, 2007). De plus, les activités anthropiques entraînant des modifications des écosystèmes et de ce fait des changements dans les communautés indigènes favoriseraient la sélection de mécanismes de résistance (Nazaret, *et al.*, 2003). Un travail préliminaire à l'évaluation de l'effet des pressions anthropiques présentes dans les sols sur la sélection de résistance aux antibiotiques chez les modèles *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* sera d'accroître les connaissances sur la prévalence des modèles dans les sols et les facteurs qui vont influencer leur présence, leur maintien et leur dispersion.

L'objectif de ce premier chapitre est d'évaluer la présence et l'abondance de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* dans les sols ainsi que l'influence de certaines activités humaines notamment industrielles et agricoles sur cette distribution. Pour cela, la présence des modèles a été recherchée par méthode cultivable à l'aide de milieux sélectifs : CAB (Cetrimide Agar Base) additionné d'acide nalidixique et VIA (Vancomycine Imipénème Amphotéricyne B) permettant respectivement l'isolement de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*, dans des sols de

France (Centre, Lorraine, Bourgogne, Limousin, Ile de France, Rhône Alpes) et d'Afrique (Tunisie, Burkina Faso). L'identification des isolats a ensuite été confirmée par méthode génétique (recherche de gènes spécifiques d'espèce et séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S) et méthode biochimique (galerie API ou vitek2 (Biomérieux)). Parallèlement à l'approche cultivable, une approche indépendante de la culture a été utilisée afin de contourner une sous-estimation des effectifs du fait de la présence de cellules viables mais potentiellement non cultivables par l'approche cultivable ou de rendre seulement compte de la présence passée de ces deux espèces (persistance de l'ADN) par l'approche indépendante de la culture. Ainsi, des tests de PCR semi-quantitative avec des amorces spécifiques des modèles (*ecfX* pour *P. aeruginosa* (Lavenir, *et al.*, 2007) et *smeD* pour *S. maltophilia* (Ribbeck-Busch, *et al.*, 2005)) ont été réalisés sur ADN total extrait de sol contenant une concentration en cible connue. Du fait de leur origine géographique très variée, les sols échantillonnés présentent des caractéristiques physico-chimiques et des couverts végétaux différents et sont également soumis à des climats différents. Des pratiques agricoles communes telles que l'irrigation et l'apport d'amendements organiques sont appliquées sur certains de ces sols. Toutefois, les législations concernant la composition des eaux d'irrigations et des amendements étant différentes entre les pays échantillonnés, la composition physico-chimique et microbiologique des apports est variable en fonction des sites. Cette étude a également eu pour objectif de constituer une collection de souches d'origine environnementale indispensable à la suite de mes travaux de thèse. En effet, une étude comparative des capacités de résistance aux antibiotiques et aux métaux sera réalisée sur une collection de souches d'origine hospitalière et environnementale de façon à évaluer l'effet de différentes activités anthropiques sur la sélection et le maintien des résistances. Pour cela, il est nécessaire de disposer d'un pool conséquent de chaque type de souches. La constitution d'une collection de souche d'origine hospitalière peut être facilement réalisée, surtout en ce qui concerne *P. aeruginosa*, du fait de la disponibilité de nombreuses souches de collections internationales. La disponibilité des informations concernant le contexte d'isolement de ces souches, le type d'infection, le traitement suivi par le patient peuvent également être faciles d'accès. En revanche, il est beaucoup plus difficile de constituer une collection de souches d'origine environnementale car peu de souches sont disponibles dans les collections internationales. De plus, les informations concernant le contexte d'isolement de ces souches et les caractéristiques des environnements d'origine sont rares. La constitution d'une collection de souches d'origine environnementale est donc une étape indispensable, représentant une activité importante de l'équipe et passe par l'isolement, l'identification et la

caractérisation d'isolats provenant d'environnements variés et mieux caractérisés. C'est pourquoi les résultats présentés dans ce chapitre résultent de travaux effectués sur plusieurs années, certains initiés avant le début de ma thèse. Ainsi, j'ai participé aux études menées sur les sols de Tunisie, du Burkina Faso et de la région Ile de France (Feucherolles et Pierrelaye) (Figure 22).

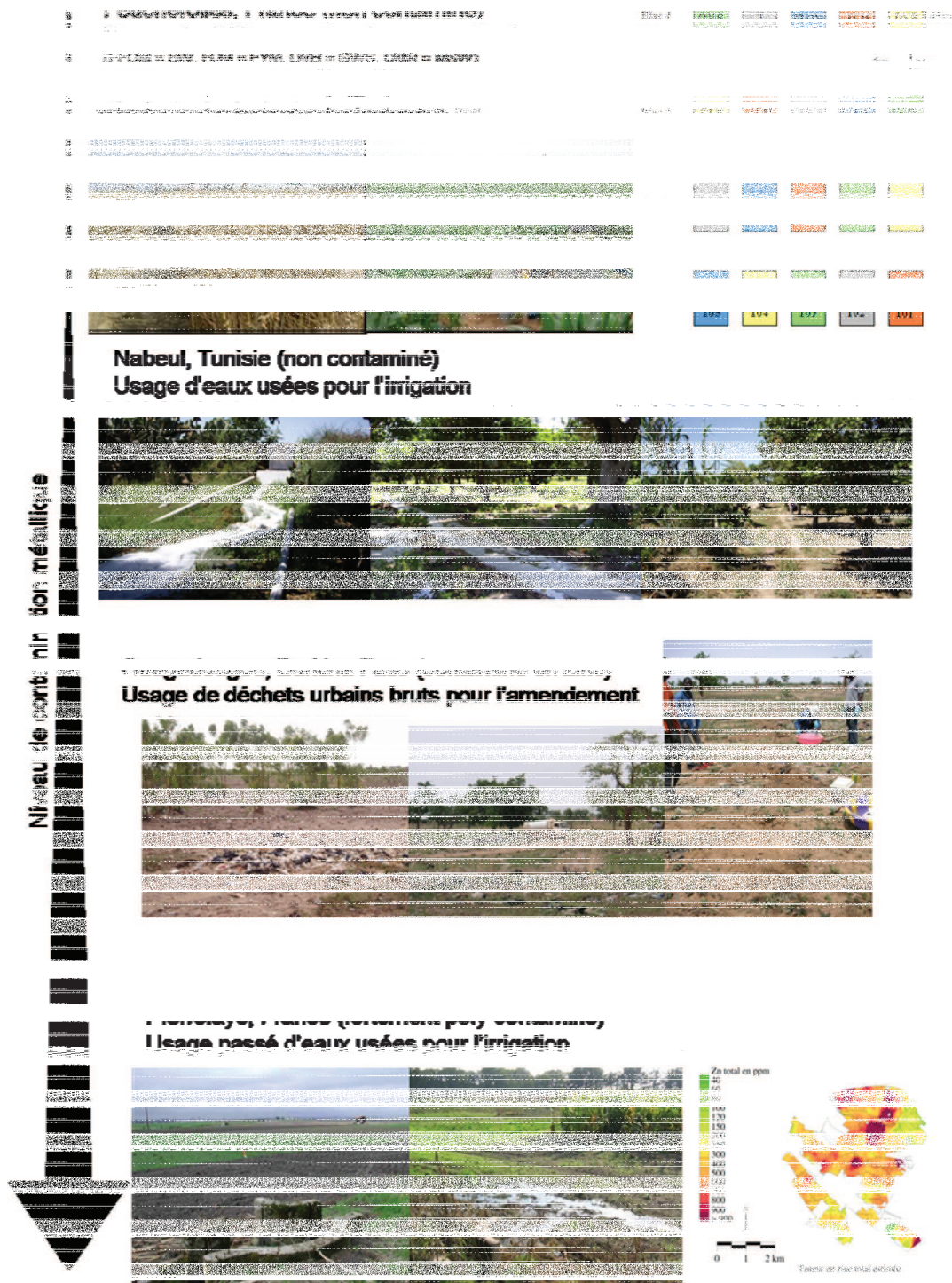


Figure 22. Présentation des sites étudiés.

Introduction (English version)

P. aeruginosa and *S. maltophilia* are Gram negative bacteria belonging to the γ -proteobacteria class. These ubiquitous bacteria present a high adaptability to a wide range of natural, as well as to anthropogenic terrestrial and aquatic environments. However, these bacteria are also known for their frequent implication in nosocomial infections enabling to qualify them of opportunistic pathogens of major public health concern (Berthelot, *et al.*, 2005). We have seen throughout the first part of this thesis that these models are widely studied in the clinical setting. These bacteria are involved in a variety of infections in people whose immune barriers are weakened (immunocompromised people, burnt, diabetics...) (Mesaros, *et al.*, 2007). They are also able to colonize lungs of cystic fibrosis individuals and can create irreversible damage to the tissues (Foweraker, 2009). In this context, numerous studies aimed at evaluating the prevalence, the distribution and the diversity of these bacteria in the hospital in order to highlight the origin of the infection. Potential reservoirs that can be responsible of the transmission to patients as medical equipments (catheters, respiratory equipment, probes...) or water network (faucet, sink, shower...) have been highlighted (Denton & Kerr, 1998, Trautmann, *et al.*, 2005). The diversity studies conducted on hospital strains generally show a great diversity, some clones presenting higher capacity to colonize hospitals for long time and being responsible of infections (Lavenir, *et al.*, 2008). Mechanisms involved in the successful interaction with the host are widely investigated in isolates responsible of infections. Virulence factors as adhesion capacity (Feldman, *et al.*, 1998, de Oliveira-Garcia, *et al.*, 2003), biofilm formation (Wagner & Iglewski, 2008) or toxin secretion leading to damage in the host (Windhorst, *et al.*, 2002, Veessenmeyer, *et al.*, 2009) as well as antibiotic and antiseptic resistance capacities (Nicodemo & Paez, 2007, Strateva & Yordanov, 2009) are essential to their success of infection and their survival and dispersal in the hospital. These capacities, especially antibiotic resistance, could also participate to the important adaptability of the two models in the environment. However, resistance capacities of environmental isolates of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* are poorly studied.

While their presence was reported in a wide range of terrestrial and aquatic environments, little information is currently available on their distribution and abundance, as well as factors that promote their presence and their dispersion in soils. The presence of *P. aeruginosa* as an

indigenous resident of soil is controversial. Most of the studies conducted on soil samples are ancient and rare, leading to contradictory results (Ringen & Drake, 1952, Green, *et al.*, 1974). Its ability to survive in soil has been questioned following the observation of the rapid death of strains of *P. aeruginosa* inoculated into soil microcosms (Zechman & Casida, 1982). On the opposite, the presence of *S. maltophilia* has been reported numerous times in the rhizosphere of different plants (Berg, *et al.*, 1996). However, in most case, abundance and factors favouring its presence and its distribution are unknown. Different studies also showed the presence of the two models in terrestrial and aquatic environments highly impacted by anthropogenic activities, having undergone contamination to hydrocarbons (Cavalca, *et al.*, 2000, Hawle-Ambrosch, *et al.*, 2007) or heavy metals (Matyar, *et al.*, 2008, Matyar, *et al.*, 2009). Moreover, isolates present in such environments are generally able to resist to a wide spectrum of molecules, including antibiotics (Filali, *et al.*, 2000, Matyar, *et al.*, 2008). Soil can be considered as a reservoir of genetic determinants implicated in antibiotic resistance (D'Costa, *et al.*, 2007). Moreover, anthropogenic activities leading to modifications in ecosystems could favour resistance mechanism selection in the indigenous communities. A preliminary work to the evaluation of the role of anthropogenic activities in soils on antibiotic resistance selection in *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* is to increase knowledge on the prevalence of the two models in soils and on the factors that could influence their presence, maintenance and spread.

The aim of this chapter is i) to evaluate the presence and abundance of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* in soils from various geographical origins in soils (Center, Lorraine, Burgundy, Limousin, Ile de France, Rhône-Alpes regions in France as well as Tunisia and Burkina Faso in Africa) and various physico-chemical characteristics, and ii) to evaluate how human activities associated to agricultural practices i.e. irrigation and organic amendments, modify pathogen distribution. The detection and quantification of the models was investigated by culturable method using selective media (CAB (Cetrimide Agar Base) + nalidixic acid and VIA (Imipenem Vancomycin Amphotéricyne B) for the isolation of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, respectively). Identification of the isolates was then confirmed by molecular methods (search for species specific genes and sequencing of the 16S rRNA gene) and biochemical methods (VITEK2 gallery (Biomerieux)). A culture-independent method was also used in order to bypass an underestimation of the effectives due to the presence of viable but not culturable cells with culture dependant method or to highlight the presence of past presence of the models (DNA persistence). Semi-quantitative PCR tests with species specific

primers (*ecfX* (Lavenir, *et al.*, 2007) and *smeD* (Ribbeck-Busch, *et al.*, 2005)) were performed on total DNA extracted from soil containing a known concentration of target as previously evaluated by the culture based approach.

This study also aimed at constituting a collection of strains of environmental origin, essential to pursue the work. Indeed, a comparative study of heavy metal and antibiotic resistance will be performed on a collection of hospital and environmental strains in order to evaluate the effect of different human activities on the selection and maintenance of the resistances. To optimize the reliability of the results we have to compare a representative pool of each group (hospital origin *versus* environmental origin) of strains. Constituting a collection of strains originating from the hospital can be easily performed, especially for *P. aeruginosa*, since numerous strains are available in international collections. Moreover, information about the isolation context, the type of infection and the therapy can be easily obtained. On the opposite, it is more difficult to constitute a collection of strains from the environment since few strains are available in international collections and information concerning these strains is often scarce. Constituting a collection of strains from the environment is a necessary step, representing an important activity of the research team and requiring the isolation, identification and characterization of isolates from various and well characterized environments. That is why results presented in this chapter originated from works done during many years some of them starting several years before my Ph. D. So, I have participated to the studies conducted on the soils sampled in Tunisia, Burkina Faso and the Ile de France region (Feucherolles and Pierrelaye) (Figure 22, page 90).

“Different occurrence of the opportunistic pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in soils”

Amélie Deredjian^{1*}, Elisabeth Brothier¹, Dominique Jocktane¹, Edmond Hien², Sabine Houot³, Makram Amane⁴, Lamia Bouziri Kemayel⁴, Claudy Jolivet⁵, Sabine Favre-Bonté¹, Sylvie Nazaret¹

¹ Université de Lyon, France; Research Group on « Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment », UMR 5557 Ecologie Microbienne, CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, and Université Lyon 1, France.

² Université de Ouagadougou, UFR /SVT 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

³ INRA, UMR 1091 Environnement et Grandes Cultures, F-78850 Thiverval-Grignon, France

⁴ Laboratoire de Traitement et Recyclage des Eaux, Centre de Recherches et Technologies Des Eaux, BP. 273, Borj Cédria, Soliman, 8020, Tunisia

⁵ INRA, Unité INFOSOL, 2163 Avenue de la Pomme de Pin, 45075 Orléans, France

Short running title: *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in soils

Keywords: *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, selective media, PCR identification, detection, soil, irrigation, organic amendment.

* Corresponding author. Mailing address: UMR 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, Mendel Bldg., 5th Floor, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. Phone: 33 (0) 4 72 43 13 24. Fax: 33 (0) 4 26 23 44 68. E-mail: aderedjian@club-internet.fr.

ABSTRACT

The occurrence of the human opportunistic pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* was monitored in soils exposed to different anthropogenic constraints (industrial sites and agricultural soils associated to different irrigation and amendment practices) and from various geographical regions (France, Tunisia, and Burkina Faso). A strategy based on culture using selective media, ceftrimide agar base supplemented with nalidixic acid for *P. aeruginosa* isolation, and VIA (vancomycine, imipenem, amphotericin B) agar media for *S. maltophilia* isolation, coupled to the confirmation of the isolate identity using validated molecular tools was used. These media enable to quantify from 10^1 CFU / g of dry soil, whereas PCR tests with species specific primers on soil DNA containing known concentration of added cells of *P. aeruginosa* or *S. maltophilia* showed a sensitivity of 10^4 CFU / g of dry soil. However, the media used enable the growth of other species, sometimes reducing their selectivity. Results showed that *P. aeruginosa* was rarely isolated from soils except from French industrial sites contaminated with hydrocarbons and a vineyard soil amended with mushroom manure in Burgundy, suggesting a sporadic presence of this bacterium in soil. On the opposite successful isolation of *S. maltophilia* was obtained for most of the tested soils irrespective of their geographical origin. Differences among sampling sites were observed with regard to *S. maltophilia* population abundance, which represented from 0.001 to 1.2 % of the total heterotrophic microflora. Intra-site variations were also observed and agricultural practices as irrigation with wastewater or organic amendments were associated to the increase of *S. maltophilia* abundance.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa and *Stenotrophomonas maltophilia* are Gram negative rods of the γ -subclass of Proteobacteria both considered to be of significance as opportunistic human pathogens being of major concern in nosocomial infections (i.e. hospital-acquired diseases) (Denton & Kerr, 1998, Kerr & Snelling, 2009). They are characterized by their ability to cause diseases in patients with a strong pre-disposition to illness, particularly in those who are severely debilitated, immuno-compromised or suffering from cystic fibrosis or HIV-infections. Increasing worldwide population and of at risk population consecutive to advances in medical therapy might then favour the incidence of infections by these opportunistic pathogens. Knowledge about their ecology and natural reservoirs is therefore important to avoid infections and outbreak. These two species are ubiquitous in a wide variety of aquatic and terrestrial environments including those generated by human activities and can colonize human, animals and plants (Ringen & Drake, 1952, Denton & Kerr, 1998, Goldberg, 2000, Berg, *et al.*, 2005). They can be found together in polymicrobial communities of diverse niches including the rhizosphere of plants (Berg, *et al.*, 2005) and the cystic fibrosis lungs (Foweraker, 2009). They share in common potential for biotechnological applications i.e. plant growth promotion, biological control of plant pathogens (Berg, *et al.*, 2005), and bioremediation activities (Hickey & Focht, 1990, Binks, *et al.*, 1995). They also have a considerable capacity of antibiotic-resistance and metabolic versatility (Pirnay, *et al.*, 2002, Crossman, *et al.*, 2008) and show ability to form biofilm and to synthesize signaling molecules and antibacterial metabolites (Dietrich, *et al.*, 2006, Ryan, *et al.*, 2008).

Regarding distribution in the environment *P. aeruginosa* is described as preferentially living in aquatic habitats and colonizing moist niches. It has been isolated from a wide range of water sources including rivers (Pellett, *et al.*, 1983, Pirnay, *et al.*, 2005), seawater (Yoshpe-Purer & Golderman, 1987), open ocean (Khan, *et al.*, 2007), distilled water (Favero, *et al.*, 1971), bottled mineral waters (Hunter, 1993), hydrotherapy facilities (Moore, *et al.*, 2002) and can be recovered in high numbers from recreative waters (Barben, *et al.*, 2005) or wastewater (Filali, *et al.*, 2000, Lavenir, *et al.*, 2007). Within hospital it has been isolated from sinks and tubs (Romling, *et al.*, 1994), tap water outlets (Reuter, *et al.*, 2002), water pipes (Lavenir, *et al.*, 2008), and even antiseptics (Anaissie, *et al.*, 2002). Its isolation from ornamental plants (Cho, *et al.*, 1974) or vegetables (Wright, *et al.*, 1976) as well as its detection in agricultural soils (Green, *et al.*, 1974, Marques, *et al.*, 1979) have also been reported. However the potential for terrestrial environments to constitute its natural habitat is still controversial since

the frequency of detection is low and its occurrence seems sporadic. For instance Ringen *et al.* (1952) isolated this bacteria from 3 out of 100 soils tested but could not re-isolate it later raising the question of its survival. Further studies on the hydrocarbon contaminated environments showed that *P. aeruginosa* is often present within contaminated soils from various geographical regions and participates to the degradation of the hydrocarbons (Sagardia, *et al.*, 1975, Deziel, *et al.*, 1996, Norman, *et al.*, 2002, Das & Mukherjee, 2007, Kaszab, *et al.*, 2009). On the opposite *S. maltophilia*, previously referred to as *P. maltophilia* and then *Xanthomonas maltophilia*, is usually reported as a telluric bacteria being preferentially recovered from the rhizosphere of diverse plants all over the world (Berg, *et al.*, 2005). Recently it has also been recovered from marine environments (Matyar, *et al.*, 2008) and from diverse deep-sea invertebrates of Pacific areas (Romanenko, *et al.*, 2008).

Most studies conducted on non hospital environments neither provided data on the cell abundance and the proportion of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* populations within the global bacterial community, or they evaluate the influence of environmental characteristics and anthropogenic constraints on the colonization of these environments. This paper is then dedicated to fill this lack of knowledge especially concerning the soil environment. Soils are characterized by their important complexity in term of the variety of habitats, offering wide range of physicochemical characteristics. Then soils harbour an immense bacterial diversity. Impacting soils with human activities can alter this diversity, selecting for new population or being sources of new microbial colonisers. Our strategy was to screen soils from various geographical areas in France and in Africa (Tunisia and Burkina Faso) allowing having soils with diverse physicochemical characteristics, under different vegetation covers and different climates. Furthermore we aimed at investigating the influence of some agricultural practices, i.e. irrigation and organic amendment on the distribution of these pathogens. Despite being common practices in France and in Africa, irrigation and organic amendment might impact differently the distribution of these two bacterial species since the chemical and microbiological quality of the water and waste used in these practices might differ due to differences in the legislation of each country. A strategy based on culture using selective media coupled to the confirmation of the isolate identity using validated molecular tools (Lavenir *et al.*, 2007; Pinot *et al.*, submitted) was used to detect *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. As a complementary work, the search for non culturable cells was performed by a culture-independent method i.e. DNA extraction coupled to PCR amplification targeting species specific markers.

MATERIAL AND METHODS

Agricultural and industrial soils from France

Soils were sampled from different locations in various agricultural areas in France including Centre, Limousin, Dombes, Burgundy, Rhône-Alpes regions and from industrial sites contaminated with hydrocarbons in Ile de France (soils kindly provided by Biogénie Europe SAS, Echarcon, France) and Lorraine region (Figure 23). Agricultural soils were planted with maize, wheat or vineyard. Samples i.e. ten sampling per field composed one sample, were collected from the upper layer (0-5, 0-10 cm or 0-20 cm), sieved (2 mm) and stored at room temperature for no longer than 2 weeks. They were collected during various campaigns between 2005 and 2008.

Experimental sites with waste water irrigation

The influence of irrigation with waste water on opportunistic pathogen prevalence was evaluated in one experimental site in France (Pierrelaye in Ile de France), and two Mediterranean sites in Tunisia (Figure 23). Physico-chemical characteristics are shown in Table 1. The Pierrelaye study area, one irrigation plot in the plain of Pierrelaye–Bessancourt, is located about 24 km northwest of Paris, covering a surface of 15 ha. According to Baize (Baize, 2002), this site was amended for 102 years with the municipal wastewater of Paris and used for monoculture of grain maize over the 30 last years. In the middle of 1960 this area was also amended with urban sludge and smut compost. Since the past 20 years soil has been irrigated from wastewater from a treatment plant system. The soil is a sandy neoluvisol typical from the Seine alluvial valley. Eighteen samples were collected in two different areas chosen according to their level of heavy metal contamination [low (LP) and heavy (HP)] polluted. Pierrelaye soils were contaminated with heavy metals (Zn, Cd Cu and Pb). Three plots were considered as control, i.e. three nearby fields never irrigated with wastewater. Samples i.e. five sampling per plot composed one sample, were collected from the upper layer (0-10 cm). Irrigation had lowered pH (values comprised between 7.23 to 7.83) and increased organic carbon content (values comprised between 2.8% to 5.22%) comparing to the control fields. The two sites Beni Khair and Souhil, in Tunisia, were planted with orange trees and citrus and irrigated with treated wastewater (TWW) from the local treatment plants or from groundwater (GW) over 25 and 19 years, respectively. These experimental sites are administered by the national INRGREF (Institut National de Recherche en Génie Rural Eaux

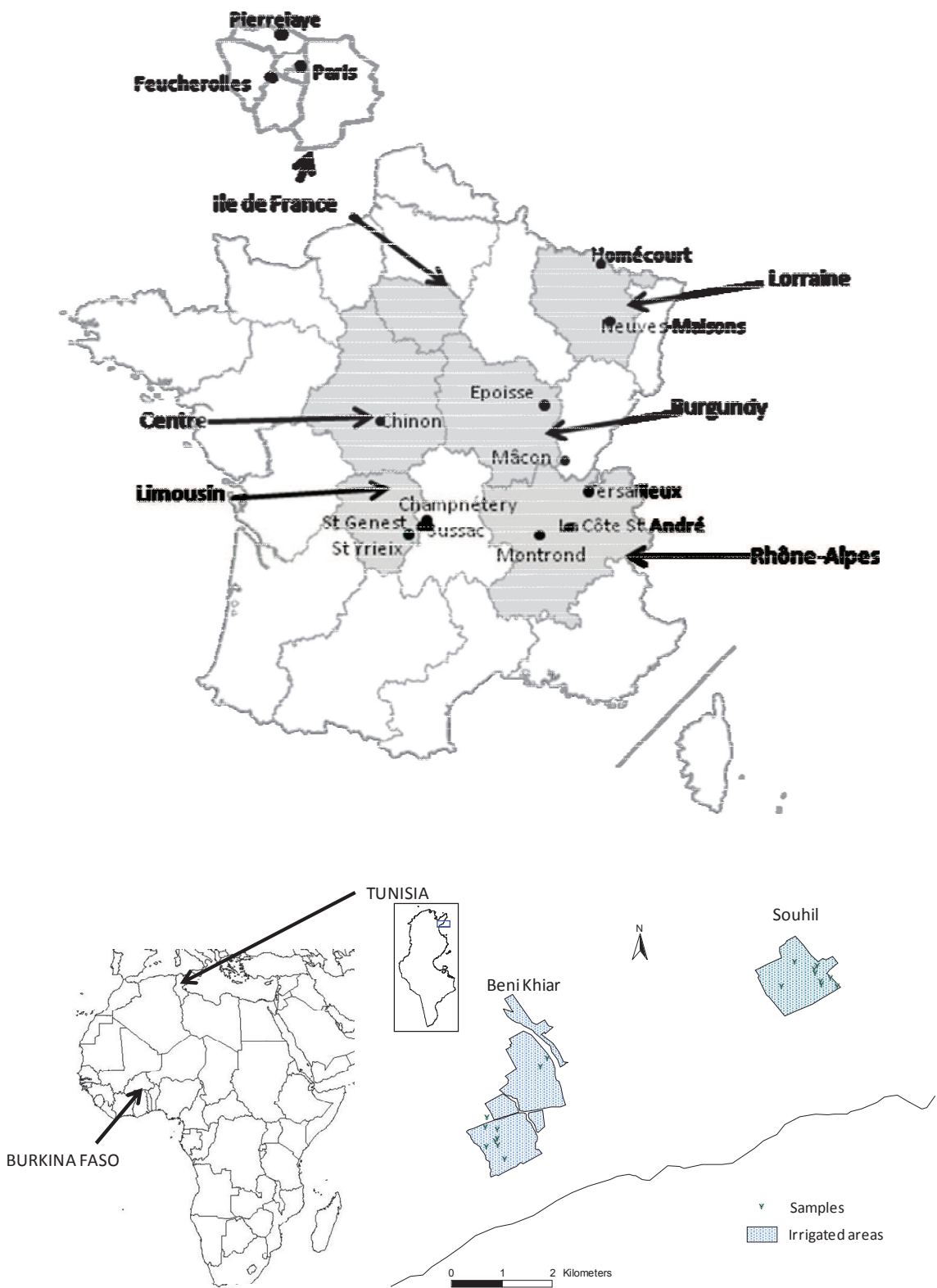


Figure 23. Studied sites in France, Burkina Faso and Tunisia.

et Forêts, Nabeul) institute. Sampling was performed by collecting 20 soil samples (10 sampling per plots composed one sample) from the upper layer on April 2009.

Experimental sites with organic amendment

The influence on opportunistic pathogen prevalence of organic amendment was evaluated in two vineyard experimental sites (Mâcon and Chinon in Burgundy) and one agricultural site (Feucherolles in Ile de France) in France, and in four sahelian sites (Tabtenga, Zagtouli, Yagma and Toudoubweogo) in the sub-urban area of Ouagadougou, Burkina Faso (Figure 23). Physico-chemical characteristics are shown in Table 1.

The experimental sites in Mâcon and near Chinon consist of seven and six organic matter treatments, respectively, each lay out with four replicates as previously described (Lejon, *et al.*, 2007). Pathogen analysis was performed on a composite sample made of the four replicates of the following treatment: plot amended with mulching with straw, plot with conifer compost and a control plot without any organic matter input in Mâcon, and plot amended with mushroom manure, farmyard manure, vine shoot). Amendments induced an increase in organic carbon content and pH remained stable (Lejon *et al.*, 2007). Sampling was made in November 2003 and april 2004 for Mâcon and Chinon, respectively. Soils were sampled from the upper layer (0-5 cm or 0-10 cm), sieved 4 mm and stored at room temperature for no longer than two weeks.

The site of Feucherolles was managed by INRA over 8 years to evaluate the positive effects of urban composts on soil fertility and their environmental impacts (Houot *et al.*, 2002). The field experiment has been cropped with a wheat-maize succession since the beginning of the experiment. The organic amendments include (1) a municipal solid waste compost (MSW) made from residual municipal wastes after selective collection of dry and clean packaging, (2) a biowaste compost (BW) made from selectively collected fermentescible fraction of municipal wastes co-composted with green wastes, (3) a compost issued from the co-composting of sewage sludge, green wastes and wood chips (GWS), and (4) a farmyard manure (FYM) issued from cow breeding. These four organic treatments are compared to a control treatment, without organic input. Amendment induced an increase in organic carbon content (Houot, *et al.*, 2002). The experiment is a randomized complete-block designed with four replicates. Samples were collected from the upper layer (0-10cm) in September 2006 (before amendment) and October 2006 (1 month after amendment). Each treatment was performed on four plots repetitions and samples were made of a composite sampling (10 samplings per plot repetition).

Table 1. Physicochemical characteristics of soils sampled from the control fields at different sites en France, Tunisia and Burkina Faso.

Sites	Depth cm	Clay g kg ⁻¹	Silt g kg ⁻¹	Sand g kg ⁻¹	pH water	organic carbon %
France						
Feucherolles	0-10	190	750	60	6.9	1.1
Mâcon	0-5	317	565	118	6.6	1.3
Chinon	0-10	94	49	857	7.9	0.65
Pierrelaye	0-10	79	127	794	8.22	1.9
Tunisia						
Souhil TWW	0-20	100	121	749	7.7	1.2
	0-20	63	61	873	8.0	1.0
	0-20	86	94	820	7.8	2.0
	0-20	64	24	912	7.7	1.6
	0-20	147	99	754	8.0	1.5
Souhil GW	0-20	216	145	639	8.3	1.1
	0-20	102	88	810	8.1	1.4
	0-20	185	191	624	8.1	1.2
	0-20	48	14	917	8.1	1
	0-20	51	26	923	8.3	0.5
Beni Khiar TWW	0-20	78	33	889	7.9	2.2
	0-20	52	8	940	7.7	0.84
	0-20	102	61	837	8.3	1.4
	0-20	87	42	871	8.2	0.75
	0-20	22	10	968	7.7	0.28
Beni Khiar GW	0-20	130	121	749	8.3	1.5
	0-20	103	99	798	8.0	1.8
	0-20	67	24	909	8.2	1.14
	0-20	38	14	948	8.1	0.58
	0-20	57	21	922	8.3	0.61
Burkina Faso						
Tabtenga	0-10	nd	nd	nd	5.63	0.35
Zagtouli	0-10	nd	nd	nd	6.17	0.35
Toudoubweogo	0-10	nd	nd	nd	5.63	0.35
Yagma	0-10	110	200	690	5.59	0.35

nd: not determined

The sites in Burkina Faso were planted or not with sorghum and impacted by untreated solid and liquid urban wastes (UW) due to long term practices (from 4 to 15 years) by local farmers. Amendment induced an increase in organic carbon content (Hien, personal communication), and pH (values comprised between 7.24 and 8.02). Soils were sampled from the upper layer (0-5 cm) and samples were made of a composite sampling (10 samplings over a 20 m transect). One or three repetitions per field were performed during two campaigns conducted in March 2007 and June 2008. In each site, we benefited of samples from fields with and without amendments (control).

Total bacterial counts

The total heterotrophic microflora was enumerated on Tryptic Soy Agar diluted ten fold (TSA1/10) (Oxoïd, Dardilly, France) medium supplemented with cycloheximide (200 mg Γ^{-1}) to impair the growth of fungi. Bacterial cells from soils were extracted by blending 5 g of soil with 50 ml of a saline solution (NaCl 0.8%) for 90 s in a Waring Blender (Eberbach Corporation, New Hampshire, USA). Extractions were performed in triplicates. Homogenized soil suspensions were serially diluted in sterile saline solution, and 100 μl of the 10^{-3} to 10^{-5} dilutions were spread on the agar plates. In all cases, three plates were inoculated per dilution. Bacterial colonies were counted after 5 days of incubation at 28°C.

Isolation and identification of *P. aeruginosa*

Bacterial cells were extracted from soil samples and soil suspensions were serially diluted (10^0 to 10^{-2} dilutions) as described above. *P. aeruginosa* isolation was performed using the Cetrimide Agar Base (CAB) medium (Oxoïd) supplemented with nalidixic acid (15 mg Γ^{-1}) and cycloheximide (200 mg Γ^{-1}). One hundred μl were usually spread on agar plate. To improve detection sensitivity attempts were made with 1 ml of soil suspension when working with soil samples from Burkina Faso and Tunisia since these soils were rich in sand and poor in organic matter. Enrichment assays were performed by transferring 2 g of soil into 20 ml of a salt solution supplemented with acetamide, as described previously (Green, *et al.*, 1974). Inoculated enrichment broths were incubated for 3 days at 28°C with shaking at 180 rpm. Serial dilutions were performed and plated. Plates were incubated at 28°C for up to 72 h. All the greenish and clearly yellowish colonies were picked up on plate for further identification. From 5 to 10 slightly fluorescent colonies under UV and 5 to 10 truly non fluorescent colonies were randomly chosen from the selective plates for each soil samples. Colonies were confirmed as *P. aeruginosa* by PCR screening with the *ecfX* gene which

encodes a sigma factor involved in extracytoplasmic functions, as previously described (Lavenir, *et al.*, 2007) and oxydase assay. All the *ecfX* and oxydase positive isolates were subjected to 16S rDNA sequencing (up to 1400 bp) to confirm their identification. When PCR screening failed to confirm isolates as *P. aeruginosa* isolates were analyzed using biochemical tests (VITEK 2, Biomérieux, France) for taxonomic identification. One representative of each well identified species as identified by VITEK 2 was subjected to 16S rDNA sequencing. When biochemical tests did not lead to excellent identification based on VITEK 2 criteria, 16S rDNA sequencing was performed for all isolates.

Isolation and identification of *S. maltophilia*

Bacterial cells were extracted from soil samples and soil suspensions were serially diluted (10^0 to 10^{-2} dilutions) as described above. *S. maltophilia* isolation was performed using the VIA (vancomycin, imipenem, amphotericine B) selective agar medium (Kerr, *et al.*, 1996) supplemented with cycloheximide ($200 \text{ mg } \Gamma^{-1}$). Plates were incubated at 28°C for up to 48 h. For each soil all the green colonies were collected and further confirmed as being *S. maltophilia* using the PCR targeting the *smeD* gene, which is part of the genes encoding for the multidrug efflux pump SmeDEF (Ribbeck-Busch, *et al.*, 2005). Partial 16S rDNA sequencing was done to identify isolates which were negative with the PCR screening.

DNA extraction from soil samples and PCR amplification

PCR assays with primers specific to *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* were performed on soil DNA with known concentrations of the 2 models to compare the detection threshold of a culture-independent method with the one of the culturable method. Concerning *P. aeruginosa*, PCR were monitored on soil DNA extracted from soil microcosms inoculated with known concentration of *P. aeruginosa* from 10^3 to 10^6 cells/g of dry soil with the *ecfX* marker (Lavenir, *et al.*, 2007). Soil microcosms were set up for 3 soils from the RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols; (Dequiedt, *et al.*, 2009)) and selected for their contrasting structure and physicochemical properties expected to influence DNA recovery and quality. For each soil, 5 g of dry sieved soil was artificially contaminated with 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU of *P. aeruginosa* PAO1 per g of dry soil. Extraction of the soil DNA was performed according to the procedure optimized by Ranjard *et al.* (2003). Regarding *S. maltophilia*, PCR were monitored with the *smeD* marker (Ribbeck-Busch, *et al.*, 2005) on DNA extracted from 1 soil from the RMQS inoculated with 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU of *S. maltophilia* K279a per g of dry soil. DNA was extracted with the FastDNASPIN® Kit (For Soil) (BIO 101, Inc.,

Carlsbad, CA), according to the manufacturer recommendations. Presence of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* was tested in DNA extracted from soils amended with GWS (4 samples) and OMR (1 sample) and from manure (3 samples) from the site of Feucherolles in which *P. aeruginosa* and/ or *S. maltophilia* were detected by the culture method.

PCR were performed in 50 µl reaction mixtures containing 1 X buffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 10 µM of each primer. Different Taq polymerases were tested according to the manufacturer advice (Taq DNA polymerase, Invitrogen; Taq DNA polymerase Q-biogen; Hot start Taq DNA polymerase, Fermentas; Phire Hot start DNA polymerase, Finnzymes; AmpliTaq Gold, Applied Biosystems). The Taq DNA polymerase (Invitrogen) was the most effective and was used for the experiment. In order to limit the inhibitor effect of soil, 0.5 µg of T4 gene 32 protein (Roche) was added per reaction. Different DNA soil quantities (5 and 50 ng) were also tested to evaluate the inhibitor effect of soil. PCR running cycles were done as previously described (Ribbeck-Busch, *et al.*, 2005, Lavenir, *et al.*, 2007).

RESULTS

Isolates identification and selectivity of the media

All the greenish fluorescent colonies recovered from the plates with the selective medium, cetrimide agar base supplemented with nalidixic acid, were identified as *P. aeruginosa*-like isolates based on *ecfX* specific amplification and oxydase assay. Sequencing of 16S rDNA always confirmed these isolates as belonging to *P. aeruginosa* species (100% homology). We checked for the identity of yellowish fluorescent colonies, slightly fluorescent colonies i.e. slight fluorescence under UV light, and non fluorescent colonies since it has been previously reported that natural isolates may be unpigmented (Pellett, *et al.*, 1983, Pirnay, *et al.*, 2005). Except a few yellowish fluorescent colonies identified as *P. aeruginosa* all colonies led to negative amplification with the *ecfX* marker. Biochemical tests on 168 isolates with an excellent identification score based on VITEK2 and 45 isolates that had not an excellent VITEK2 identification, coupled to the 16S rDNA sequencing led to the identification of *P. putida*, *P. fluorescens* and *Pseudomonas sp.* for the non *P. aeruginosa* yellowish colonies. These colonies were usually mucoid. The 62 non fluorescent colonies were mostly confirmed as belonging to the *Pseudomonas* genera (*P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. mendocina*, *P. oryzihabitans* and *Pseudomonas sp.*). A few colonies were identified as *Burkholderia cepacia* complex species, *Ralstonia sp.* or *Achromobacter xylosoxidans*. All the poorly or non

fluorescent colonies were sometimes very abundant on plates and could have hampered the isolation of *P. aeruginosa*. From 0 (Burkina Faso soils) up to 2.09×10^5 CFU/g dry weight (amended Feucherolles soils) were enumerated on the selective medium without the identification of any *P. aeruginosa* isolates.

The VIA (Vancomycin Imipenem Amphotericin B) selective medium, was developed to isolate *S. maltophilia*. About 95% of the colonies obtained from the various soil samples that showed the morphotype of *S. maltophilia* isolates (green colonies with a blue surrounding) were identified as *S. maltophilia* by specific PCR and confirmed by sequencing of 16S rDNA. The isolates with a *S. maltophilia* morphotype that gave a negative result to the *smeD* PCR belonged to *Stenotrophomonas rhizophila*, *Variovorax* sp., or *Janthinobacterium* sp.. Depending on soil samples, the proportion of colonies with a non *S. maltophilia* morphotype varied between 10 and 30%. These colonies were not identified.

Abundance of culturable *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* in soil samples

Our screening of soil samples for the presence of *P. aeruginosa* was mostly unsuccessful whatever the geographical origin (various regions in France, Tunisia, and Burkina Faso) of the soils (Tables 2, 3 and 4). The only samples collected in France that enabled direct isolation from soil suspension originated from the industrial sites contaminated with hydrocarbons, two located in Ile de France and one located in Lorraine (soil from Neuves-Maisons). The numbers of *P. aeruginosa* per g of equivalent dry soil were 1.1×10^3 , 3.37×10^3 and 0.325×10^3 in the three soils, respectively. These levels are in the range of the estimated detection limits of 10 to 100 CFU per g of dry soil i.e. 1 or 10 colonies per plate when spreading 1 μ l or 1 ml of soil suspension from the undiluted soil solution, respectively. This sensitivity corresponds to optimal conditions meaning that the amount of non *P. aeruginosa* cells able to grow on the selective media does not hampered growth and visualization of *P. aeruginosa* cells. Compared to the total heterotrophic microflora we estimated that *P. aeruginosa* populations represented 0.14% of the microflora from the Neuves-Maisons soil. The enrichment step with acetamide allowed the isolation of *P. aeruginosa* in the third sample from Ile de France but not from the Homécourt soil in Lorraine.

Enumeration on the VIA selective agar medium coupled to the PCR amplification with the specific gene marker showed the presence of *S. maltophilia* in 9 out of the 12 tested soils from the Burgundy region, with densities from 0.803×10^3 to 7.16×10^3 CFU per g of dry soil (Table 2) representing 0,005 % of the total heterotrophic microflora (Figure 24).

Table 2. Number of CFU (colony forming unit) of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, in agricultural and industrial soils sampled from various French regions.

Site	Description at time of sampling (amendment or treatment in the year)	<i>P. aeruginosa</i> CFU x 10 ³ (standard deviation)	<i>S. maltophilia</i> CFU x 10 ³ (standard deviation)
Limousin			
St Iriex	maize	0	nd
St Iriex	grassland	0	nd
Champnétery	wheat	0	nd
Champnétery	grassland	0	nd
St Genest	maize	0	nd
St Genest	grassland	0	nd
Sussac	wheat	0	nd
Sussac	grassland	0	nd
Rhône-Alpes			
Versailleux1	soil from a pheasant aviary	0 (-)	nd
Versailleux2	maize	0 (-)	nd
Versailleux3	feces and straw inside pheasant building	0 (-)	nd
La Côte Saint André	maize	0 (-)	nd
Montrond	grassland	0 (-)	nd
Ile de France			
Site 1	Hydrocarbon polluted soil	0(+)	nd
Site 2	Hydrocarbon polluted soil	1.1 (± 0.23)	nd
Site 3	Hydrocarbon polluted soil	3.37(± 0.139)	nd
Lorraine			
Homécourt	Hydrocarbon polluted soil	0 (-)	nd
Neuves-Maisons	Hydrocarbon polluted soil	0.325(± 0.057)	nd
Burgundy			
Balot	barley	0	0
Venarey les laumes	grassland	0	0
Is sur Tille	rape, (farmyard manure)	0	2.60 (± 0.284)
Bourberain	bulk soil, rape field	0	2.85 (± 1.39)
Dompierre en Morvan	grassland	0	0
Ruffey les Echirey	rape, (vegetal compost)	0	7.16 (± 0.538)
Marcilly Ogny	triticale, (farmyard manure)	0	6.67 (± 0.353)
Commarin	bulk soil, rape field	0	4 (0)
Echevronne	cereal	0	5.88 (± 1.02)
Morey St Denis	vineyard	0	1.19 (± 0.11)
St Aubin	vineyard	0	0.803 (± 0.069)
Enesad	bulk soil, cereal field	0	3.21 (± 0.139)
Epoisse1	vineyard (70 ppm Cu)	0 (-)	nd
Epoisse1	vineyard (200 ppm Cu)	0 (-)	nd

nd: not done.

Table 3. Number of CFU (colony forming unit) of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, in soils exposed to irrigation with waste water in the French and Tunisian sites.

Site		<i>P. aeruginosa</i> CFU	<i>S. maltophilia</i> CFU 10 ³ (standard deviation)
Pierrelaye	Control 1	0	3.33 (± 2.49)
	Control 2	0	0.67 (± 0.47)
	Control 3	0	0.33 (± 0.47)
	4	0	27.67 (± 7.36)
	5	0	0.67 (± 0.94)
	6	0	47.67 (± 14.82)
	7	0	4.33 (± 1.25)
	8	0	2 (± 2.16)
	9	0	4 (± 5.66)
	10	0	0.67 (± 0.94)
	11	0	4 (± 2.16)
	12	0	1.33 (± 0.94)
	13	0	0.33 (± 0.47)
	14	0	16 (± 2.16)
	15	0	4.67 (± 2.05)
	16	0	11.33 (± 1.25)
	17	0	0
	18	0	0.33 (± 0.47)
	19	0	0
	20	0	0
	21	0	0
Tunisie	Souhil TWW	0	37.3 (± 1.52)
		0	9.33 (± 1.52)
		0	0.33 (± 0.572)
		0	8.33 (± 2.31)
		0	1.67 (± 1.53)
		0	8 (± 1)
	Souhil (EN)	0	1.77 (± 0.577)
		0	21 (± 6.04)
		0	0.667 (± 0.567)
		0	7.33 (± 2.08)
		0	31.3 (± 2.08)
		0	3.67 (± 2.08)
	Beni Khiar TWW	0	1.67 (± 0.577)
		0	1 (0)
		0	89.7 (± 9.02)
		0	4.67 (± 2.31)
		0	2 (± 1)
		0	2.67 (± 3.79)
Beni Khiar EN	0	4.67 (± 2.52)	
	0	0	

Table 4. Number of CFU (colony forming unit) of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, in soils exposed to organic amendment in France, and Burkina Faso.

Site		<i>P. aeruginosa</i> CFU x 10 ³ g soil dry weight	<i>S. maltophilia</i> CFU x 10 ³ g soil dry weight (standard deviation)
Mâcon	Control	0 (-)	nd
	mulching straw	0 (-)	nd
	conifer compost	0 (-)	nd
Chinon	Control	0 (-)	nd
	mushroom manure	0 (+ ; 5 colonies)	nd
	vine shoot	0 (-)	nd
	farmyard manure	0 (-)	nd
Feucherolles	soil before Amendment		
	Control	0 (-)	186.7 (± 84.9)
	BW	0 (-)	130.5 (± 95.1)
	FYM	0 (-)	232.5 (± 109.1)
	GWS	0 (-)	367.1 (± 51.8)
	MSW	0 (-)	210.4 (± 233.0)
	soil 1 month after Amendment		
	Control	0 (-)	1.59 (± 0.6)
	BW	0 (-)	13.5 (± 2.8)
	FYM	0 (-)	7.79 (± 3.3)
	GWS	0 (-)	17.2 (± 3.9)
	MSW	0 (-)	414.4 (± 52.3)
	Amendment		
	BW	0 (-)	0
	FYM	38 (± 5.03)	13.90 (± 7.08)
GWS	0 (-)	0	
MSW	0 (-)	0	
Burkina Faso	Tabtenga, 2008, Control	0	0
	Tabtenga, 2008, UW	0 (-)	1.81 (± 3.13)
	Toudoubwéogo, 2008, Control	0	0
	Toudoubwéogo, 2008, UW	0 (-)	0.453 (± 0.78)
	Zagtouli, 2008, Control	0	0.45 (± 0.38)
	Zagtouli, 2008, UW	0 (-)	1.920 (± 3.32)
	Toudoubwéogo, 2007, Control	0	0
	Toudoubwéogo, 2007, UW	0	0.067 (± 0.048)
	Yagma NZ, 2007, Control	0	0
	Yagma NZ, 2007, UW	0	0.182 (± 0.685)
	Yagma, EAPIT, 2007 Control	0	0
Yagma, EAPIT, 2007, UW	0 (+, 1 colony)	0.1 (± 0.052)	

nd: not done.

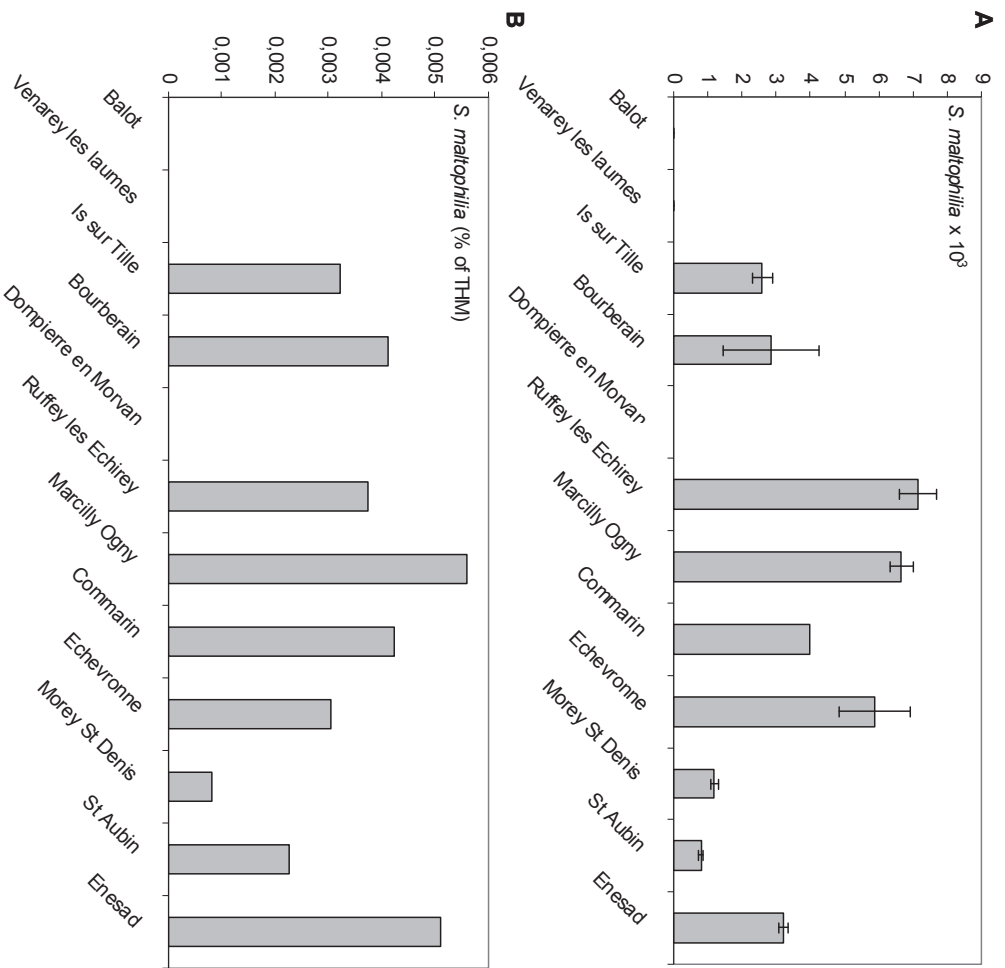


Figure 24. *S. maltophilia* counts in soils of the Burgundy region (RMQS) (A) and percentage in the total heterotrophic (B).

S. maltophilia was also detected in the soils from the Pierrelaye and Feucherolles sites in France and in the soils from Tunisia and Burkina Faso. However, variability was observed between the sites and within sites both considering the density of *S. maltophilia* and the proportion of that species in the total heterotrophic community. For instance *S. maltophilia* was detected at 7.16×10^3 CFU per g of dry soil in the control soil of Feucherolles, from 0.667×10^3 to 21×10^3 CFU per g of dry soil in the 5 soil samples of the Souhil area irrigated with groundwater and 0 CFU in 5 out of the 6 control soil samples from the Burkina Faso sites. Similarly *S. maltophilia* population represented from 0,001 % to 1,2 % of the total heterotrophic microflora (*S. maltophilia* count: 1.6×10^3 to 1.7×10^5 ; total heterotrophic microflora count: 0.9×10^7 and 1.7×10^7 colonies forming unit per g of equivalent dry soil, respectively) (Figures 25, 26 and 27).

Prevalence of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* in irrigated soil

Effect of irrigation with wastewater on the presence of *P. aeruginosa* in soil was investigated in the sites of Pierrelaye and Tunisia. No *P. aeruginosa* were detected whether soils were irrigated or not. On the opposite, *S. maltophilia* was present in both sites. In the site of Pierrelaye, the abundance of this bacterium varied between 0.333×10^3 and 47.7×10^3 CFU per g of equivalent dry soil (Table 3) (Figure 25). The highest densities and proportion of *S. maltophilia* were observed in soils 4, 6, 14 and 16, which are characterized by high level of heavy metal contamination. In the Tunisian site, despite intra-site variability, the highest densities were observed in soils irrigated with wastewater. The observed densities were in the range of those observed in the Pierrelaye site, varying between 0.33×10^3 to 89.7×10^3 CFU per g of equivalent dry soil (Table 3).

Prevalence of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* in soils amended with organic wastes

As observed in the control soil direct isolation of *P. aeruginosa* from the organic amended soils of Mâcon and Chinon was unsuccessful whatever the type of amendment. However the enrichment procedure enabled the isolation of *P. aeruginosa* from a vineyard soil amended with mushroom manure in Chinon.

The four organic amendments applied in September 2006 on the agricultural soils of the experimental site of Feucherolles (France) were screened for the presence of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* (Figure 26). We were able to isolate both pathogens from the manure samples and both were absent in the other amendments.

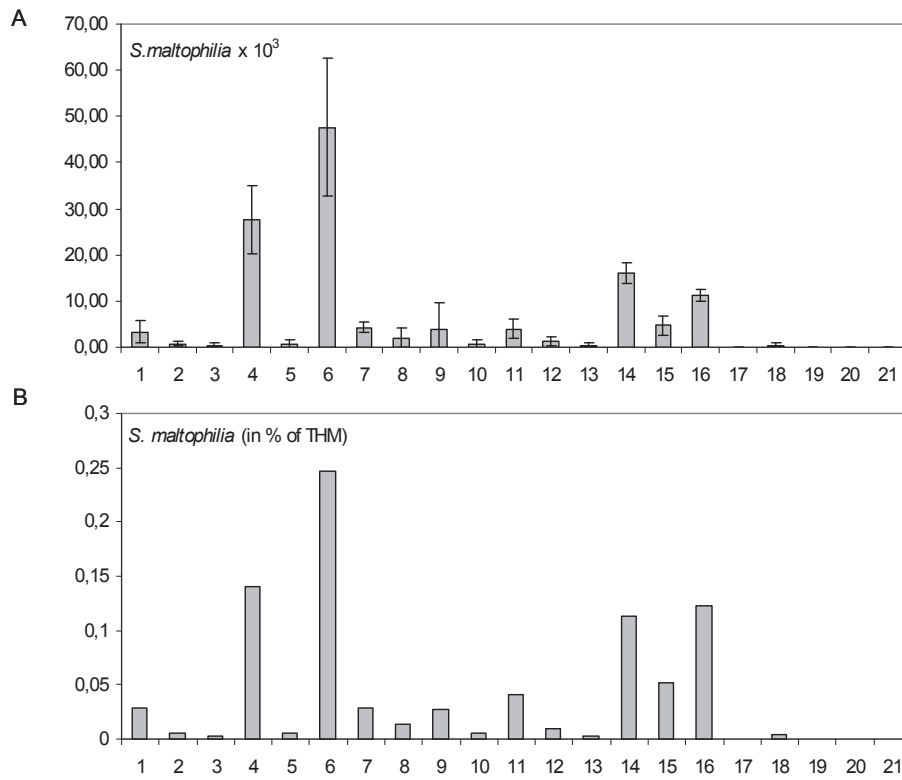


Figure 25. *S. maltophilia* counts in soils from the site of Pierrelaye (A) and percentage in the total heterotrophic microflora (B).

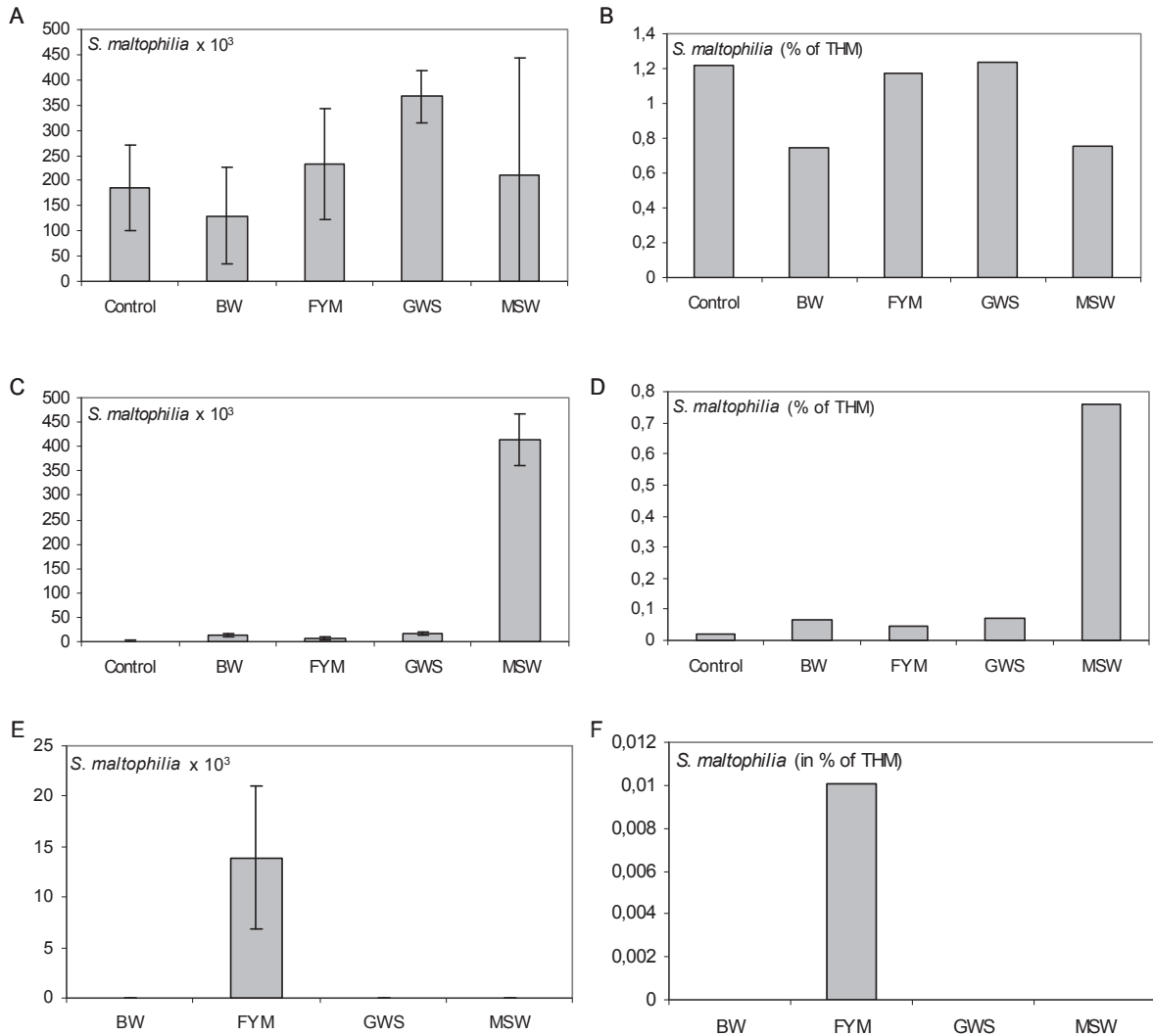


Figure 26. *S. maltophilia* counts in soils and amendments from the site of Feucherolles (A, C, E) and percentage of *S. maltophilia* in the total heterotrophic microflora (B, D, F), before amendment (A, B) 1 month after amendment (C, D) and in the amendments (E, F).

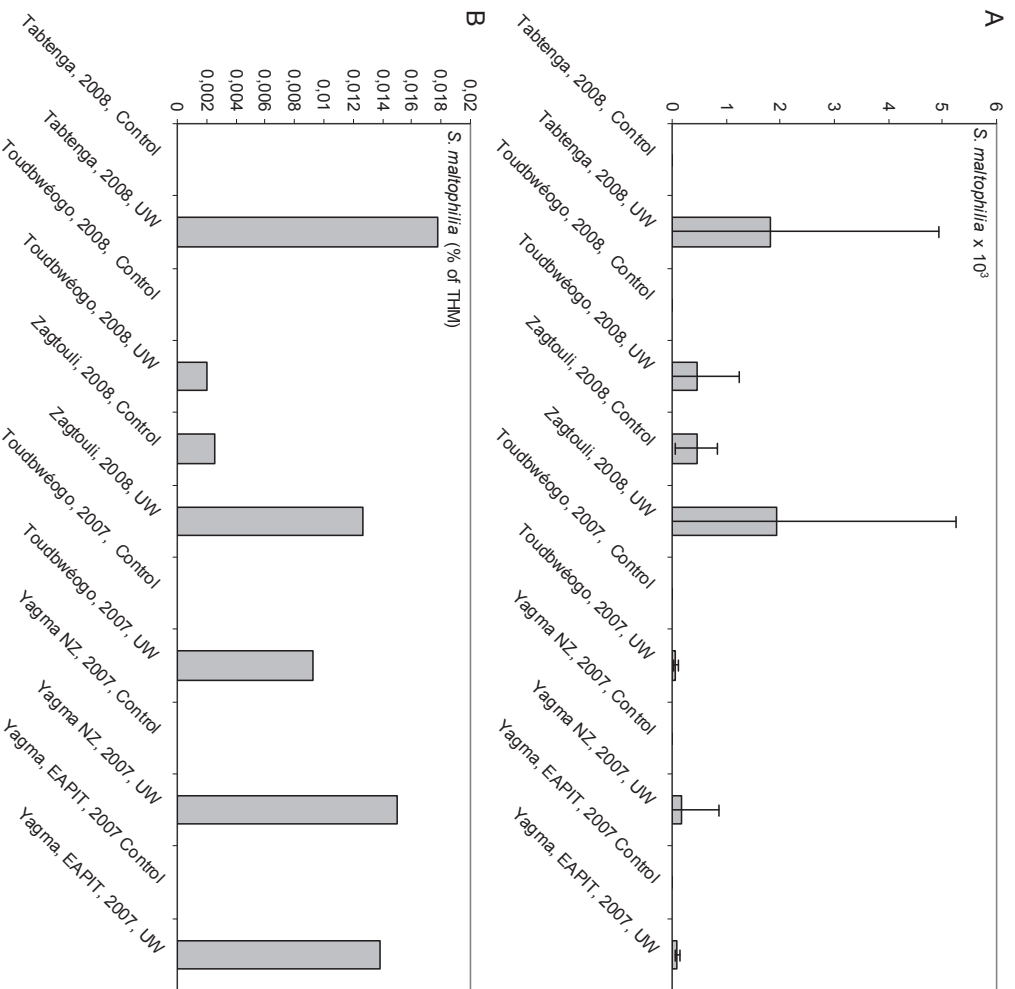


Figure 27. *S. maltophilia* counts in soils from the sites in Burkina Faso (A) and percentage in the total heterotrophic microflora (B).

The manure samples showed 38×10^3 and 13.9×10^3 CFU per g of equivalent dry weight of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, respectively. In this sample the total heterotrophic bacteria was 1.07×10^8 CFU per g of equivalent dry weight in 2006. Then *P. aeruginosa* represented 0.01% of the total heterotrophic bacteria. No *P. aeruginosa* were found in the soil amended with manure one month and 3 months after the treatment as well as in other investigated soils. In this site, *S. maltophilia* population represented up to 1.2% of the total heterotrophic microflora in soil before amendment with GWS, which correspond to the highest density observed comparing to the other tested sites. Little differences were obtained between the plots before treatments concerning both the prevalence of heterotrophic microflora and *S. maltophilia* population, with about 10^7 and 10^5 CFU per g of equivalent dry soil, respectively. One month after amendment, we observed a difference between non treated and treated plots considering both the total heterotrophic microflora and *S. maltophilia* population. The total heterotrophic microflora was higher in all amended soils comparing to non treated soils with a maximal difference of $\times 6.1$, when the MSW compost was used. For *S. maltophilia* population, we observed a higher difference than for the total heterotrophic microflora in all amended soils and the effective was 260 times higher in soils treated with MSW than in non treated plots.

The presence of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* was also investigated in soils amended with urban rough waste from 6 agricultural sites in the vicinity of Ouagadougou, Burkina Faso. No *P. aeruginosa* were detected in the amended soils. Enrichment assay performed on 4 samples from 4 sites led to the isolation of a unique *P. aeruginosa* isolate from the soil of Yagma EAPIT site. On the opposite, an effect of the use of urban rough waste was observed on the prevalence of *S. maltophilia*. Five out of the 6 control plots were devoid in *S. maltophilia* while in amended plots the number of CFU per g of equivalent dry soil reached 2×10^3 in Tabtenga and Zagtouli soils (Table 4). A maximal $\times 4.3$ increase was observed in the site of Zagtouli. In comparison the total heterotrophic microflora was maximally multiplied by 2.6 (Figure 27). However, we did not have the opportunity to test the amendment for the presence of *S. maltophilia*.

Detection of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* in soil DNA extract

Detection of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* using a culture-independent method was essayed. PCR amplification with species specific primers on DNA extracted from soils with known concentration of the bacteria was done. With 5 ng of soil DNA per reaction, a positive amplification was obtained in the inoculated soils containing 10^5 CFU per g of dry soil for

both models. With 50 ng of soil DNA, amplification was obtained for 2 of the 3 inoculated soils containing 10^4 CFU of *P. aeruginosa* per g of dry soil, no amplification was observed with the third soil, whatever the number of inoculated cells. No amplification was obtained from DNA extracted from manure that naturally contained *P. aeruginosa* (10^4 CFU per g of dry weight detected by the culture method) whatever the quantity of DNA used (5 and 50 ng). With 50 ng of soil DNA, a positive amplification was also obtained in the soil containing 10^4 CFU of *S. maltophilia* per g of dry soil. No amplification was obtained in inoculated soils containing lower amount of cells whatever the quantity of DNA per reaction. With 50 ng of DNA, a positive amplification was also obtained with DNA extracted from manure (1.4×10^4 CFU per g of dry weight detected by the culture method) and from 1 soil amended with GWS (10^6 CFU per g of dry soil detected by culture method). No positive amplification was obtained for the other tested soils whatever the quantity of DNA used (5 and 50 ng) despite the detection of around 10^5 CFU per g of dry soil with the culture method.

DISCUSSION

Culture based approach involving the use of selective media combined to a fast biochemical and/or genotypic analysis is classically used for the detection of bacterial pathogens in the context of clinical studies. We used a similar strategy and evaluated its relevance to determine the prevalence of two opportunistic pathogen species, *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, in soils and evaluated the influence of anthropogenic activities expected to modify such prevalence either through the impact on the indigenous bacterial populations (selection and enrichment of these pathogenic species) or by adding allochthonous bacteria (presence of the pathogens in the irrigation water and the organic amendment). Some soil samples were further selected to evaluate whether a culture-independent approach based on direct DNA extraction from soil samples and amplification with species specific markers would improve the detection sensitivity and reliability. Since DNA might persist in soil after cell death this approach would also give indication of past presence of the pathogen species but non survival for instance when pathogen are added from external sources.

Selectivity of the media

Most selective media for the isolation of *P. aeruginosa* rely on its ability to synthesize pigments, pyocyanin and fluorescein (Brown & Lowbury, 1965, Brodsky & Nixon, 1973,

Green, *et al.*, 1974). The addition of antibiotics to which *P. aeruginosa* presents intrinsic resistance enables increased selectivity of the media. We used cetrimide agar base medium, containing cetrimide, a quaternary ammonium compound which inhibits the growth of other microorganisms, and magnesium chloride and potassium sulfate which stimulate the synthesis of pigments. We supplemented this medium with nalidixic acid to facilitate *P. aeruginosa* recovery and identification from soil samples (Ringen & Drake, 1952). This medium generally shows a high selectivity when used to screen clinical samples. Kodaka and collaborators screened around 1000 urine, pus and sputum samples and 98 % of the colonies obtained on this medium were confirmed as *P. aeruginosa* (Kodaka, *et al.*, 2003). On the opposite, our results highlighted a lower effectiveness of this medium in the isolation of *P. aeruginosa* from soil samples. The presence of numerous non fluorescent colonies, due to the presence in the microflora of species able to grow on the medium, increases the difficulty to isolate *P. aeruginosa*. The microflora of soil samples is characterized by a high diversity and the widespread of closely related species as fluorescent *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. syringae*...) and other proteobacterial genera as *Acinetobacter* sp., *Rhizobium* sp., or *Burkholderia* sp. (Kaszab, *et al.*, Cho & Tiedje, 2000, Khan, *et al.*, 2007, Atzel, *et al.*, 2008, Casanovas-Massana, *et al.*, 2010) whom we demonstrated the ability to grow on this medium. This increases the difficulty of *P. aeruginosa* isolation and identification from microbiologically complex environments. Such limited effectiveness to isolate *P. aeruginosa* from environmental samples was previously reported for water samples. As an extreme example, Khan and collaborators screened 1670 colonies on cetrimide-nalidixic acid agar from 17 water samples (open ocean, bay...) and only 62 were confirmed as *P. aeruginosa* (Khan, *et al.*, 2007). In our study, other conditions of growth such as incubation of the plates at 37°C or 42°C were tested and we observed that they enhanced the specificity of the medium since less non fluorescent colonies grew on the plates (data not shown). However we did not use such stringent conditions since these temperatures might not be appropriate for indigenous populations expected to be rarely exposed to these high temperatures and might select for adapted isolates. In order to enhance the probability of *P. aeruginosa* isolation, an enrichment step was done for several soil samples. The enrichment solution contains acetamide, which highlights the capacity of *P. aeruginosa* to produce ammonia from acetamide (Green, *et al.*, 1974). However, adding the enrichment step only enables to determine if the selected bacteria are present but not to quantify it. This step was tested for 24 samples and enabled to isolate *P. aeruginosa* only in 2 samples for which isolation without enrichment step was negative.

The VIA (Vancomycin Imipenem Amphotericin B) selective medium, was developed to isolate *S. maltophilia* from clinical samples and replaced the *Xanthomonas maltophilia* selective medium XMSM (Kerr, *et al.*, 1996). The specificity of the VIA medium relies on the capacity of *S. maltophilia* to resist intrinsically to imipenem due to chromosomally encoding β -lactamases (Gould, *et al.*, 2006). Mannitol and bromothymol blue give a particular morphotype to *S. maltophilia* isolates. The colonies become green and the agar surrounding becomes blue due to the alkalization of the media by *S. maltophilia* since this species does not produce acid by mannitol fermentation. In the present study the isolation of *S. maltophilia* from environmental samples was not as difficult as the isolation of *P. aeruginosa*. Even if the VIA medium was first developed for clinical use, it showed a high selectivity because of the addition of several antibiotics and the presence of the colour indicator (which gives the particular morphotype of *S. maltophilia* colonies), enabling its use for screening environmental samples. Only 10 to 30 % of the colonies presenting the *S. maltophilia* morphotype were not confirmed to belong to this species. Pinot and collaborators (submitted) showed that some environmental species were able to grow with the *S. maltophilia* morphotype on VIA as *S. rhizophila*, *Dyella sp* or *Variovorax sp.*.

Evaluation of the prevalence and abundance with culturable method and genotyping confirmation were fastidious and time consuming for both models. However this approach was more effective than the culture-independent one (PCR with specific primers) and presented a better detection threshold (10^1 and 10^4 CFU per g of dry soil, respectively). Moreover, culturable method allowed the conservation of the isolated strains for supplemental analysis (metabolic diversity, resistance phenotypes...). More accurate PCR-based techniques such as the quantitative real time PCR are under investigation in our research team to improve sensitivity and facilitate the handling of a high number of samples.

Sporadic detection of *P. aeruginosa* in soil samples

The screening for the presence of *P. aeruginosa* of various soil samples from agricultural lands in France, Tunisia or Burkina Faso was mostly unsuccessful despite different environmental conditions in term of climate, physicochemical properties and vegetation cover of these lands. The only samples that led to the detection of *P. aeruginosa* were collected from a mushroom manure amended vineyard site (Chinon, France) and from an urban waste amended field (Yagma, Burkina Faso). Furthermore the abundance of *P. aeruginosa* was very low since only 5 and 1 isolates were successfully obtained from the Chinon and the Tabtenga sites, respectively, despite the enrichment procedure. These results raise the question of the

agricultural soil as a natural habitat of *P. aeruginosa*. Few studies investigated the soil as a potential reservoir of this opportunistic pathogen. The oldest study on the occurrence of *P. aeruginosa* in soil was conducted by Ringen and Drake (Ringen & Drake, 1952). They found *P. aeruginosa* in only 3 out of 100 soil samples. Later, Green and collaborators (Green, *et al.*, 1974) recovered that species from 24% of the California soils tested and suggested that their isolation rate was better than the one from Ringen and Drake due to the use of a more efficient isolation technique. They used an enrichment step with acetamide and could not isolate *P. aeruginosa* without that enrichment. These observations led to conclude on agricultural soil as a natural habitat for the bacterium since these soils had no known history of organic fertilizer use, or pasturing of animals and irrigation water was free of the bacterium. In our work, with or without enrichment, we mostly failed to recover *P. aeruginosa* isolates from agricultural samples which had not received amendment or irrigation with waste water suggesting that if soil is a natural habitat for that species then this species is a minor population whose abundance is below the detection limit of our experimental procedure (10 to 100 cells per one gram equivalent dry soil).

As mentioned above, isolation of *P. aeruginosa* was successful in an amended vineyard site (Chinon, France). This soil had the particularity of being amended with mushroom manure. At the time we sampled that soil we had not the opportunity to obtain mushroom manure samples to check whether the manure was the source of *P. aeruginosa* in soil or whether *P. aeruginosa* was an autochthonous member of the soil microflora. However *P. aeruginosa* could have been present in that amendment since mushroom manure contains equine manure and we previously detected *P. aeruginosa* in three months old horse manure (Lavenir, *et al.*, 2007). The capacity of *P. aeruginosa* to persist in manure and then in amended soil was not reported yet, but such persistence had already been demonstrated for other pathogenic bacteria. For instance, the presence of pathogens implicated in illness outbreaks i.e. *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. (Pell, 1997, Gerba & Smith, 2005), in manure or composts is well documented. Most of these bacteria are eliminated by the composting process, but some of them can persist at the end of this process (Lemunier, *et al.*, 2005). These bacteria are often able to persist in the amended soil and can be transferred to the plants (Gagliardi & Karns, 2002, Solomon, *et al.*, 2002). In our study the experimental site of Feucherolles (France) gave us the opportunity to investigate the survival of *P. aeruginosa* in soil. Despite the presence of *P. aeruginosa* in the manure we failed to recover this bacterium in the manure amended soil as we failed to recover it from the plots amended with the various composts. The latter result was more expected since *P.*

aeruginosa was not detected in these composts. The presence of *P. aeruginosa* was also investigated in soils amended with urban rough waste from the 6 sites in Burkina Faso. Again, we failed to detect *P. aeruginosa* in both amended and non amended soils except for the isolation of one colony from the Yagma amended field. We expected to detect it given that untreated waste can contain potential pathogenic bacteria as *Salmonella* or *E. coli* in a higher density than in treated amendment and the fecal coliforms and streptococci, indicators of fecal contamination, frequently reach a density of $10^7/10^8$ CFU per g of dry weight (around 10^3 in treated composts) (Deportes, *et al.*, 1998, Hassen, *et al.*, 2001). Moreover, *P. aeruginosa* has already been found in Nigerian soil which had been amended with urban waste (Achudume & Olawale, 2009).

Effect of irrigation with wastewater on the presence of *P. aeruginosa* in soil was also investigated in the sites of Pierrelaye and Tunisia. As *P. aeruginosa* is frequently present in wastewater (Schwartz, *et al.*, 2006, Lavenir, *et al.*, 2007), the presence of this bacterium was also expected in the irrigated soils. However, no detection was observed in soils irrigated with wastewater as well as in soils not irrigated with wastewater. Moreover, the site of Pierrelaye had been irrigated with sewage sludge during many years and is highly contaminated with organic compounds and heavy metals. The absence of *P. aeruginosa* in this site was rather unexpected as *P. aeruginosa* is known for its capacities to degrade different organic compounds (Roy & Nair, 2007) and to resist to heavy metals (Hassan, *et al.*, 2008). A diversity study of the resistant microflora present in the wastewater of Casablanca even showed that *P. aeruginosa* isolates were among the most resistant isolates considering metals, antibiotics and hydrocarbons (Filali, *et al.*, 2000). These observations suggested that *P. aeruginosa* is not indigenous to the bacterial community of this soil i.e. no *P. aeruginosa* detection in the control soil neither in the field amended with urban waste compost and *P. aeruginosa* is not able to survive after introduction through an external organic source probably due to antagonistic interaction with the indigenous microflora (predation, substrate competition) or non favourable physicochemical soil properties. However we can not exclude that *P. aeruginosa* survived but become non-culturable, as in aquatic environments (Kimata, *et al.*, 2004) or that our experimental approach failed to detect its presence because of a lack of sensitivity.

P. aeruginosa was also present in 4 of the 5 industrial sites impacted with hydrocarbons. This result was expected since this species is frequently isolated from various aquatic (Bartha, 1977, Bhattacharya, *et al.*, 2000) and terrestrial (Sagardia, *et al.*, 1975, Cavalca, *et al.*, 2000, Norman, *et al.*, 2002, Kaszab, *et al.*, 2009) hydrocarbon-impacted environments. In those

environments *P. aeruginosa* is either capable to degrade the hydrocarbons and/or act as an ‘helper’ population which facilitates the accessibility to the hydrocarbons due to the synthesis of biosurfactant (i.e. rhamnolipid) (Sagardia, *et al.*, 1975, Garcia-Junco, *et al.*, 2001). Similarly its ability to synthesize pyocyanin, an inhibitor of other bacterial species, might enhance its competitiveness and survival in petroleum contaminated sites (Norman *et al.*, 2004). In such environment, intake of hydrocarbons or organic amendment could favor the emergence of this population. As we only isolated *P. aeruginosa* from soils impacted by anthropogenic activities, we can hypothesize that *P. aeruginosa* is more probably brought by amendments as manure than an endemic population of the soil. Zechman and Casida (1982) showed that inoculation of *P. aeruginosa* in an unsterilized soil conducted to the rapid death of the inoculum. These observations suggest that *P. aeruginosa* can be sporadically found in soil, but may not multiply and disseminate in this environment unless particular conditions such as the presence of specific organic compounds favor its growth. Further studies would need to be done in order to clarify how environmental parameters influence its development and colonization of soil habitat.

Widespread occurrence of *S. maltophilia* in soil and influence of agricultural practices on its prevalence

S. maltophilia was isolated from most soils whatever their geographical origin (soils from Feucherolles, Pierrelaye, and Burgundy in France as well as soils from Tunisia and Burkina Faso) (Tables 2, 3 and 4). This result was expected since soil was considered as a reservoir of *S. maltophilia* (Ryan, *et al.*, 2009). Its presence in the rhizosphere is well known and its capacities to promote plant growth (Juhnke & des Jardin, 1989, Berg, *et al.*, 1996, Park, *et al.*, 2005) or to inhibit several pathogenic fungi (Juhnke, *et al.*, 1987, Jakobi, *et al.*, 1996) were reported. Several properties were mentioned to explain the success of *S. maltophilia* to survive in the rhizosphere, such as metabolic properties or presence of genes (*rebA-C*) which could protect the bacterium against predators (Ryan, *et al.*, 2009). In our study the success of isolation and the proportion of *S. maltophilia* isolates varied between and within the sites. Agricultural soils of the Burgundy region, which did not undergo particular treatments, were less colonized by *S. maltophilia*, (< 0.005 % of the total heterotrophic microflora) compare to the others (Figure 24). The site of Feucherolles was the most colonized site (presence of the species in all tested samples) and population of *S. maltophilia* represented up to 1.2 % of the total heterotrophic microflora (Figure 26). Sampling 3 months and a year after amendment still enabled its detection (data not shown) evidencing the persistence of the species and the

role of soil environment as a reservoir of *S. maltophilia*. The impact of the amendment on its prevalence in soil was clearly evidenced by the experimentation on the site of Feucherolles. The maximal effect was obtained with the MSW amendment with an x 260 increase of the *S. maltophilia* population and an x 6.1 increase of the total heterotrophic microflora comparing to the control plot that was not amended. The increase of *S. maltophilia* population was always higher than the increase of the heterotrophic microflora for all tested amendments. In order to know if such increase was due to the spread of intrinsic population or to the intake of *S. maltophilia* present in composts, we tested the different amendments for the presence of *S. maltophilia*. As *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* was only present in the manure (13.9×10^3 CFU per g of equivalent dry weight), indicating that the increase of *S. maltophilia* population was rather due to the increase of the indigenous population.

The effect of the use of urban rough waste as compost in soils in Burkina Faso also showed that amendment led to an increase of both the total heterotrophic microflora and *S. maltophilia* population (Figure 27). This effect was higher for *S. maltophilia* population than for the total heterotrophic microflora. However, we did not have the opportunity to test the amendment for the presence of *S. maltophilia*. Regarding the impact of irrigation, the investigation performed in the site of Pierrelaye showed that *S. maltophilia* prevalence was variable, but the highest densities were observed in soils which were contaminated with heavy metals (Figure 25). Similarly, Tunisian soils irrigated with wastewater were more colonized by *S. maltophilia* than soils irrigated with groundwater.

In three out of the four tested experimental sites, we observed that the prevalence of *S. maltophilia* was higher in soils that had been amended with organic amendments or irrigated with wastewater. Amendments or wastewater can bring different carbon sources, nutrients or indispensable elements for the growth of the indigenous microflora, but it can also bring different compounds like heavy metals, hydrocarbons compounds, antibiotics, pesticides..., associated to different anthropogenic activities. A higher prevalence of *S. maltophilia* in such contaminated soils could be related to its capacities to use different organic compounds. *S. maltophilia* strains that show such activities were often isolated from the rhizosphere of plants or contaminated soils (Binks, *et al.*, 1995, Duineveld, *et al.*, 2001, Vallini, *et al.*, 2005, Antonioli, *et al.*, 2007, Marecik, *et al.*, 2008). Some of them can survive in presence of several toxic compounds as Juhasz and Naidu showed with a strain of *S. maltophilia* isolated from a soil contaminated by pentachlorophenol. This strain was able to grow in presence of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated- and nitro-aromatic compounds and DDT pesticide (Juhasz & Naidu, 2000). High level of resistance to heavy metals as Cd, Pb, Co, Zn,

Hg, Ag, has also been observed in a strain isolated in contaminated soils (Pages, *et al.*, 2008). Moreover, sequencing of two *S. maltophilia* genomes highlights the presence of chromosomally encoding genes, especially encoding efflux pumps, potentially implicated in resistance to several toxicants as antibiotics (β -lactams, aminoglycosides...) or heavy metals (As, Hg, Cu...). These genes could enable *S. maltophilia* to adapt to a wide range of environments (Crossman, *et al.*, 2008, Taghavi, *et al.*, 2009). Then, the presence of *S. maltophilia* in extreme or polluted environments had already been reported (Matyar, *et al.*, 2008, Romanenko, *et al.*, 2008, Kuddus & Ramteke, 2009), which corroborates the idea of *S. maltophilia* as a highly adaptable organism. This adaptability could make *S. maltophilia* more competitive in presence of compounds brought by organic amendments or wastewater that generally impact the microbial community and could explain the spread of the indigenous soil population in amended soils of the different experimental sites. Our results highlight the impact of human activities, especially agricultural practices, on the selection and spread of pathogens of major public health interest like *S. maltophilia*. Actually, the genetic and phenotypic characteristics of these soil isolates are determined and compared to clinical isolates. Preliminary data evidenced biochemical variability as well as differences in antibiotic resistance profiles in relation to soil origin and multidrug resistance similar to clinical isolates (data not shown).

Concluding remarks

Sequencing of genomes of both models enable to make hypothesis that could explain the differences in *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* distribution in soils observed in this study. Widespread of these bacteria in a large panel of environments could be explained by a large genome and a high proportion of regulatory determinants (Stover, *et al.*, 2000, Mathee, *et al.*, 2008, Rocco, *et al.*, 2009). Moreover, a large part of their genome is conserved among strains, suggesting a high adaptability of the strains, whatever their origin. Differences highlighted in this study in their distribution could be explained by the fact that *S. maltophilia* seems to possess more genetic determinants implicated in multi-drug resistance in their conserved genome than *P. aeruginosa*, making it more competitive against microbial producers present in the rhizosphere. Moreover, *S. maltophilia* genomes possess a large number of genomic islands (around 40) in both sequenced genomes whereas *P. aeruginosa* possess a more variable number of genomic islands (between 10 and 50), suggesting that *S. maltophilia* is more likely able to acquire genetic mobile elements that could participate to increase its

capacity of adaptation. Finally, many ORFs have no known function and could participate to the differences observed between *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*.

In most investigated sites, sampling has been done only one time, given a fixed image of the distribution of the models. A more detailed spatial and a seasonal variation analysis would need to be done in order to identify the factors that control the pathogen distribution, as well as to determine their survival capacity especially for *P. aeruginosa*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a CORUS project of the French “Ministère des Affaires étrangères” and a EC2CO project supported by the INSU and INEE departments of CNRS. A. Deredjian was funded by a grant from the CNRS. We thank participants of the CORUS and EC2CO projects for soil sampling. We thank the PARMIC technical platform and Rhône-Alpes Region Cluster “Environnement”. We thank Veolia for providing the amendments used in the site of Feucherolles.

REFERENCES

- Achudume AC & Olawale JT (2009).** Occurrence of antibiotic resistant bacteria in waste site of Ede south west Nigeria. *J Environ Biol* 30: 187-189.
- Anaissie EJ, Penzak SR & Dignani MC (2002).** The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. *Arch Intern Med* 162: 1483-1492.
- Antonioli P, Lampis S, Chesini I, Vallini G, Rinalducci S, Zolla L & Righetti PG (2007).** *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02, a new bacterial strain suitable for bioremediation of selenite-contaminated environmental matrices. *Appl Environ Microbiol* 73: 6854-6863.
- Atzel B, Szoboszlay S, Mikuska Z & Kriszt B (2008).** Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Hyg Environ Health* 211: 143-155.
- Baize D (2002).** Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français. *Courrier de l'environnement de l'INRA* 22.
- Barben J, Hafen G & Schmid J (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* in public swimming pools and bathroom water of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 4: 227-231.

- Bartha R (1977).** The microbiology of aquatic oil spills. *Adv Appl Microbiol* 22: 225-266.
- Berg G, Marten P & Ballin G (1996).** *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape - Occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiological Research* [MICROBIOL. RES.]. 151: 19-27.
- Berg G, Eberl L & Hartmann A (2005).** The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* 7: 1673-1685.
- Berg J, Tom-Petersen A & Nybroe O (2005).** Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett Appl Microbiol* 40: 146-151.
- Bhattacharya M, Roy SS, Biswas D & Kumar R (2000).** Effect of Mg(2+) ion in protein secretion by magnesium-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water of Haldia port. *FEMS Microbiol Lett* 185: 151-156.
- Binks PR, Nicklin S & Bruce NC (1995).** Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl Environ Microbiol* 61: 1318-1322.
- Brodsky MH & Nixon MC (1973).** Rapid method for detection of *Pseudomonas aeruginosa* on MacConkey agar under ultraviolet light. *Appl Microbiol* 26: 219-220.
- Brown VI & Lowbury EJ (1965).** Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Pathol* 18: 752-756.
- Casanovas-Massana A, Lucena F & Blanch AR (2010).** Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006. *J Microbiol Methods*.
- Cavalca L, Confalonieri A, Larcher S & Andreoni V (2000).** Evolution of a degradative bacterial consortium during the enrichment of naphtha solvent. *J Appl Microbiol* 88: 1009-1018.
- Cho JC & Tiedje JM (2000).** Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl Environ Microbiol* 66: 5448-5456.
- Cho JJ, Schroth MN, Kominos SK & Green SK (1974).** Ornamental plants as carriers of *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytopathology* 65.
- Crossman LC, Gould VC, Dow JM, et al. (2008).** The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9: R74.

- Das K & Mukherjee AK (2007).** Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour Technol* 98: 1339-1345.
- Denton M & Kerr KG (1998).** Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 11: 57-80.
- Deportes I, Benoit-Guyod JL, Zmirou D & Bouvier MC (1998).** Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting. *J Appl Microbiol* 85: 238-246.
- Dequiedt S, Thioulouse J, Jolivet C, et al. (2009).** Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environmental Microbiology Reports* 1: 251-255.
- Deziel E, Paquette G, Villemur R, Lepine F & Bisailon J (1996).** Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 62: 1908-1912.
- Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M & Newman DK (2006).** The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 61: 1308-1321.
- Duineveld BM, Kowalchuk GA, Keijzer A, van Elsas JD & van Veen JA (2001).** Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 67: 172-178.
- Favero MS, Carson LA, Bond WW & Petersen NJ (1971).** *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* 173: 836-838.
- Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M & Blaghen M (2000).** Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr Microbiol* 41: 151-156.
- Foweraker J (2009).** Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull* 89: 93-110.
- Gagliardi JV & Karns JS (2002).** Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environ Microbiol* 4: 89-96.
- Garcia-Junco M, De Olmedo E & Ortega-Calvo JJ (2001).** Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. *Environ Microbiol* 3: 561-569.
- Gerba CP & Smith JE, Jr. (2005).** Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J Environ Qual* 34: 42-48.
- Goldberg JB (2000).** *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends Microbiol* 8: 55-57.

- Gould VC, Okazaki A & Avison MB (2006).** Beta-lactam resistance and beta-lactamase expression in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates having defined phylogenetic relationships. *J Antimicrob Chemother* 57: 199-203.
- Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SK & Vitanza-jack VB (1974).** Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 28: 987-991.
- Hassan SH, Abskharon RN, El-Rab SM & Shoreit AA (2008).** Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. *J Basic Microbiol* 48: 168-176.
- Hassen A, Belguith K, Jedidi N, Cherif A, Cherif M & Boudabous A (2001).** Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresour Technol* 80: 217-225.
- Hickey WJ & Focht DD (1990).** Degradation of mono-, di-, and trihalogenated benzoic acids by *Pseudomonas aeruginosa* JB2. *Appl Environ Microbiol* 56: 3842-3850.
- Houot S, Clergeot D, Michelin J, Francou C, Bourgeois S, Caria G & Ciesielski H (2002).** Agronomic Value and Environmental Impacts of Urban Composts Used in Agriculture. *Microbiology of composting*.
- Hunter PR (1993).** The microbiology of bottled natural mineral waters. *J Appl Bacteriol* 74: 345-352.
- Jakobi M, Winkelmann G, Kaiser D, Kempler C, Jung G, Berg G & Bahl H (1996).** Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J Antibiot* (Tokyo) 49: 1101-1104.
- Juhasz AL & Naidu R (2000).** Enrichment and isolation of non-specific aromatic degraders from unique uncontaminated (plant and faecal material) sources and contaminated soils. *J Appl Microbiol* 89: 642-650.
- Juhnke ME & des Jardin E (1989).** Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Appl Environ Microbiol* 55: 747-750.
- Juhnke ME, Mathre DE & Sands DC (1987).** Identification and Characterization of Rhizosphere-Competent Bacteria of Wheat. *Appl Environ Microbiol* 53: 2793-2799.
- Kaszab E, Kriszt B, Atzel B, Szabo G, Szabo I, Harkai P & Szoboszlay S (2010).** The Occurrence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* on Hydrocarbon-Contaminated Sites. *Microb Ecol* 59: 37-45.
- Kaszab E, Kriszt B, Atzel B, Szabo G, Szabo I, Harkai P & Szoboszlay S (2009).** The Occurrence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* on Hydrocarbon-Contaminated Sites. *Microb Ecol*.

- Kerr KG & Snelling AM (2009).** *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 73: 338-344.
- Kerr KG, Denton M, Todd N, Corps CM, Kumari P & Hawkey PM (1996).** A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 607-610.
- Khan NH, Ishii Y, Kimata-Kino N, Esaki H, Nishino T, Nishimura M & Kogure K (2007).** Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb Ecol* 53: 173-186.
- Kimata N, Nishino T, Suzuki S & Kogure K (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. *Microb Ecol* 47: 41-47.
- Kodaka H, Iwata M, Yumoto S & Kashitani F (2003).** Evaluation of a new agar medium containing cetrimide, kanamycin and nalidixic acid for isolation and enhancement of pigment production of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. *J Basic Microbiol* 43: 407-413.
- Kuddus M & Ramteke PW (2009).** Cold-active extracellular alkaline protease from an alkaliphilic *Stenotrophomonas maltophilia*: production of enzyme and its industrial applications. *Can J Microbiol* 55: 1294-1301.
- Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S & Cournoyer B (2007).** Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J Microbiol Methods* 70: 20-29.
- Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, et al. (2008).** Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *J Appl Microbiol* 105: 1491-1501.
- Lejon DP, Sebastia J, Lamy I, Chaussod R & Ranjard L (2007).** Relationships between soil organic status and microbial community density and genetic structure in two agricultural soils submitted to various types of organic management. *Microb Ecol* 53: 650-663.
- Lemunier M, Francou C, Rousseaux S, Houot S, Dantigny P, Piveteau P & Guzzo J (2005).** Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. *Appl Environ Microbiol* 71: 5779-5786.
- Marecik R, Kroliczak P, Czaczyk K, Bialas W, Olejnik A & Cyplik P (2008).** Atrazine degradation by aerobic microorganisms isolated from the rhizosphere of sweet flag (*Acorus calamus* L.). *Biodegradation* 19: 293-301.
- Marques AM, Congregado F & Simon-Pujol DM (1979).** Antibiotic and heavy metal resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. *J Appl Bacteriol* 47: 347-350.

- Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, et al. (2008).** Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3100-3105.
- Matyar F, Kaya A & Dincer S (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci Total Environ* 407: 279-285.
- Moore JE, Heaney N, Millar BC, Crowe M & Elborn JS (2002).** Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Commun Dis Public Health* 5: 23-26.
- Norman RS, Frontera-Suau R & Morris PJ (2002).** Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl Environ Microbiol* 68: 5096-5103.
- Pages D, Rose J, Conrod S, Cuine S, Carrier P, Heulin T & Achouak W (2008).** Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One* 3: e1539.
- Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S & Sa T (2005).** Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol Res* 160: 127-133.
- Pell AN (1997).** Manure and microbes: public and animal health problem? *J Dairy Sci* 80: 2673-2681.
- Pellett S, Bigley DV & Grimes DJ (1983).** Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 45: 328-332.
- Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, et al. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environ Microbiol* 4: 898-911.
- Pirnay JP, Matthijs S, Colak H, et al. (2005).** Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ Microbiol* 7: 969-980.
- Reuter S, Sigge A, Wiedeck H & Trautmann M (2002).** Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit Care Med* 30: 2222-2228.
- Ribbeck-Busch K, Roder A, Hasse D, de Boer W, Martinez JL, Hagemann M & Berg G (2005).** A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated *Stenotrophomonas rhizophila*. *Environ Microbiol* 7: 1853-1858.
- Ringen LM & Drake CH (1952).** A study of the incidence of *Pseudomonas aeruginosa* from various natural sources. *J Bacteriol* 64: 841-845.

- Rocco F, De Gregorio E, Colonna B & Di Nocera PP (2009).** *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: A start-up comparison. *Int J Med Microbiol*.
- Romanenko LA, Uchino M, Tanaka N, Frolova GM, Slinkina NN & Mikhailov VV (2008).** Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. *Arch Microbiol* 189: 337-344.
- Romling U, Wingender J, Muller H & Tummeler B (1994).** A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol* 60: 1734-1738.
- Roy U & Nair D (2007).** Biodiversity of organotin resistant *Pseudomonas* from west coast of India. *Ecotoxicology* 16: 253-261.
- Ryan RP, Fouhy Y, Garcia BF, et al. (2008).** Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 68: 75-86.
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, et al. (2009).** The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7: 514-525.
- Sagardia F, Rigau JJ, Martinez-Lahoz A, Fuentes F, Lopez C & Flores W (1975).** Degradation of benzothiophene and related compounds by a soil *Pseudomonas* in an oil-aqueous environment. *Appl Microbiol* 29: 722-725.
- Schwartz T, Volkman H, Kirchen S, Kohnen W, Schon-Holz K, Jansen B & Obst U (2006).** Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 158-167.
- Solomon EB, Yaron S & Matthews KR (2002).** Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol* 68: 397-400.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, et al. (2009).** Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75: 748-757.
- Vallini G, Di Gregorio S & Lampis S (2005).** Rhizosphere-induced selenium precipitation for possible applications in phytoremediation of se polluted effluents. *Z Naturforsch C* 60: 349-356.

Wright C, Kominos SD & Yee RB (1976). *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. *Appl Environ Microbiol* 31: 453-454.

Yoshpe-Purer Y & Golderman S (1987). Occurrence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Israeli coastal water. *Appl Environ Microbiol* 53: 1138-1141.

Conclusions

La présence et l'abondance de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* dans les sols ont été évaluées par méthode cultivable et indépendante de la culture. La méthode cultivable, bien que plus contraignante, a montré une meilleure efficacité que la méthode de PCR semi-quantitative. En effet, les tests de PCR semi-quantitative n'ont montré une amplification qu'à partir de 10^4 cellules / g de sol sec pour les deux modèles. La méthode cultivable, quant à elle, permet de dénombrer à partir de 10^1 cellules / g de sol sec. Toutefois, on peut considérer que cette méthode sous-estime la quantité de cellules réellement présentes puisqu'elle ne permet pas de dénombrer les bactéries viables non cultivables, contrairement à des méthodes indépendantes de la culture. De plus, malgré l'utilisation de milieux dits spécifiques pour l'isolement des modèles, nous avons pu observer au cours de notre étude la croissance d'autres espèces bactériennes sur ces milieux, en particulier sur celui spécifique de *P. aeruginosa*. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ces milieux sont surtout mis au point et utilisés en milieu clinique et que la microflore présente dans l'environnement, en particulier dans les sols est plus diverse qu'à l'hôpital. La présence d'espèces phylogénétiquement proches de *P. aeruginosa* telles que *P. fluorescens* ou *P. syringae* ainsi que d'autres espèces capables de se développer sur le milieu utilisé telles que *Rhizobium sp.* ou *Burkholderia sp.*, qui sont considérées comme des habitants indigènes du sol, a participé à la difficulté d'isolement de *P. aeruginosa*.

En ce qui concerne la distribution des modèles, nous avons pu constater que la présence de *P. aeruginosa* dans ces sols n'est que sporadique et associée à la présence de contaminants (hydrocarbures) ou d'apports organiques (fumier). De ce fait, l'endémicité de *P. aeruginosa* dans les sols semble peu probable et l'hypothèse d'un apport exogène par des activités humaines telles que l'amendement ou l'irrigation est l'hypothèse privilégiée à l'issue de cette étude.

Certains facteurs comme la présence d'hydrocarbures sur des sites industrialisés pourraient être responsables du maintien de cette espèce, amenée dans les sols par différentes activités anthropiques (contamination par l'Homme lui-même, utilisation de canalisations, de machines pouvant introduire cette espèce dans les sols), en modifiant l'équilibre de la communauté microbienne et en favorisant le développement de *P. aeruginosa*, connue pour ses capacités à dégrader un grand nombre de molécules organiques. En revanche, la présence de *S. maltophilia* dans tous les sols testés semble confirmer que cette espèce est bien un habitant

indigène du sol, pouvant constituer une part importante de la microflore hétérotrophe totale (jusqu'à 1,2 %). De plus, l'apport d'amendements ou l'irrigation avec des eaux usées, semblent favoriser le développement des populations de *S. maltophilia* (jusqu'à x 260). L'augmentation des effectifs des populations de *S. maltophilia* observée suite à ces traitements peut s'expliquer d'une part par un apport exogène de nouvelles cellules (présence dans le fumier), d'autre part par l'apport de nutriments ou d'éléments essentiels à la survie et à la multiplication de la communauté indigène incluant la population de *S. maltophilia*. Enfin, ces pratiques peuvent également être à l'origine de l'apport de contaminants tels que les métaux lourds ou les molécules organiques, qui vont favoriser la sélection et la propagation de populations présentant de grandes capacités d'adaptation comme *S. maltophilia*.

Conclusions (English version)

The presence and abundance of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* in soils were investigated by culture dependent and culture independent methods. The culture dependent method showed a higher sensitivity allowing the detection of 10^0 to 10^1 cells / g of dry soil whereas semi-quantitative PCR enabled amplification from 10^4 cells / g of dry soil. However, culture dependent detection might underestimate the amount of cells present since it does not count the viable but non-culturable bacteria. Moreover, despite the use of specific media for the isolation of the models, we observed the growth of other bacterial species, especially on *P. aeruginosa* specific medium, that might hamper the growth of *P. aeruginosa* cells. These results could be explained by the fact that these media are primarily developed and used in clinical settings and that the microflora in the environment, especially in soils, is more diverse than in hospital. The presence of species phylogenetically close to *P. aeruginosa* such as *P. fluorescens* or *P. putida* as well as other genera i.e. *Burkholderia*, *Ralstonia*, able to grow on the medium used, which are considered as indigenous inhabitants of the soil, have contributed to the difficulty of isolation of *P. aeruginosa*.

Concerning the distribution of the models, we found that the presence of *P. aeruginosa* in these soils is sporadic and associated to the presence of contaminants (hydrocarbons) or organic intakes (manure). Thus, *P. aeruginosa* endemicity in soil seems unlikely and the hypothesis of an exogenous intake by human activities such as amendments or irrigation is the preferred hypothesis in our study. Some factors like the presence of hydrocarbons on industrial sites could be responsible of the maintenance of this species, brought in soil by various human activities (contamination by man himself, using pipes, machines introducing this species in soils), by altering the equilibrium of the microbial community and promoting the development of *P. aeruginosa*, known for its ability to degrade several organic molecules. On the opposite, the presence of *S. maltophilia* in all investigated soils seems to confirm that this species is an indigenous inhabitant of the soil, and can constitute a significant part of the total heterotrophic microflora (until 1.2 %). Moreover, intake of organic amendments and irrigation with wastewater seems to favour the increase of *S. maltophilia* populations (until x 240). Such increases could be explained first due to an exogenous intake of new cells (presence in manure) or by intake of nutrients or elements essential to the survival and multiplication of the indigenous microbial community including *S. maltophilia* population. Finally, these practices could also lead to the intake of contaminants as heavy metals or

organic compounds that favour the spread of population presenting high adaptation capacities such as *S. maltophilia*.

Chapitre 2 : Evaluation des phénomènes de co-sélection de résistance aux métaux et aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*

Chapter 2: Evaluation of heavy metal and antibiotic resistance co-selection in *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*

Introduction

P. aeruginosa et *S. maltophilia* sont décrites comme des bactéries ubiquistes largement répandues dans un large panel d'environnements naturels et anthropisés, ce qui suggère qu'elles pourraient partager les mêmes niches écologiques. Or, nous avons pu constater dans le premier chapitre expérimental une répartition différente des modèles *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* dans les sols. Ainsi, la prévalence de *P. aeruginosa* dans les sols est faible et sa présence dans le fumier laisse à penser que sa présence dans les sols serait plutôt liée à un apport secondaire par l'amendement ou l'eau d'irrigation plutôt qu'à son endémicité dans les sols. A l'opposé, *S. maltophilia* a été mise en évidence dans tous les sols investigués, étayant l'hypothèse de son endémicité dans les sols.

Malgré des différences de prévalence et d'abondance des deux modèles dans les sols, nous avons pu constater que certaines activités anthropiques pouvaient influencer positivement leur distribution et leurs effectifs. Cet effet peut être direct par l'introduction de bactéries présentes dans l'eau d'irrigation ou dans les amendements tels que le fumier. Dans ce dernier cas, les bactéries introduites peuvent présenter des résistances particulières aux antibiotiques du fait que les animaux dont elles proviennent peuvent avoir été traités. L'effet peut également être indirect et dû à la présence de contaminants tels que les molécules organiques ou les métaux lourds, sélectionnant des espèces ou des souches présentant de meilleures capacités d'adaptation. L'effet de ces contaminants dans les environnements anthropisés sur la sélection et le maintien de résistance aux antibiotiques a en effet été suggéré dans différentes études (Filali, *et al.*, 2000, Berg, *et al.*, 2005, Matyar, *et al.*, 2008). En particulier, la présence de métaux lourds dans les sols, qui sont à la fois réceptacles et accumulateurs de ces composés toxiques et réservoirs de déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques, pourrait favoriser la sélection et la dispersion de populations de bactéries résistantes aux antibiotiques par des phénomènes de co-sélection de résistance. Toutefois, la plupart des études s'intéressant à ces phénomènes sont menées à l'échelle des communautés et ne tiennent pas compte de la présence de populations pouvant présenter un intérêt en santé publique telles que les bactéries pathogènes opportunistes.

Les capacités de résistance aux antibiotiques chez les souches d'origine environnementale des deux modèles *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* font l'objet de peu d'études. Ces études sont menées sur peu de souches, souvent isolées d'environnements particuliers entraînant des résultats contradictoires. En revanche, la capacité de résistance aux antibiotiques est

considérée comme un facteur majeur impliqué dans la survie dans l'hôpital et fait l'objet de nombreuses études chez les souches d'origine clinique. Ces bactéries sont intrinsèquement résistantes à un large panel de molécules antibiotiques grâce à la faible perméabilité de leur membrane, la présence de pompes à efflux et d'enzymes modifiant les antibiotiques, mécanismes codés par des déterminants génétiques chromosomiques (Sanchez, *et al.*, 2009, Strateva & Yordanov, 2009). Ces bactéries présentent également une capacité importante à l'acquisition de résistance soit par mutation soit par acquisition de plasmides, transposons ou intégrons par transfert horizontal, entraînant l'émergence de clones multi-résistants (Toleman, *et al.*, 2007, Gould, 2008).

Ce chapitre se divise en deux parties. L'objectif de la première partie est d'identifier dans l'environnement des facteurs agissant comme pressions de sélection favorables à l'émergence et au maintien de résistance aux antibiotiques chez les modèles *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. La présence de métaux pouvant être à l'origine de la co-sélection de résistance aux métaux et aux antibiotiques que ce soit à faible ou forte concentration, une attention particulière a également été apportée aux capacités de résistance aux métaux des deux modèles. Ainsi, nous avons évalué les capacités de résistance aux métaux et aux antibiotiques chez des souches des deux modèles isolées des environnements étudiés dans le chapitre précédant et les avons comparées à celles de souches isolées du milieu hospitalier (environnement hospitalier, patients, personnes atteintes de mucoviscidose) et nous avons recherché par PCR la présence de gènes impliqués dans la résistance. Les travaux réalisés sur *P. aeruginosa* ont été menés sur une collection de souches environnementales constituée de souches isolées des sols contaminés en hydrocarbures, des vignobles et de fumier. La prévalence de *P. aeruginosa* étant faible dans les sols, nous avons complété notre collection avec des souches d'origine aquatique et isolées d'élevages de serpents caractérisées par notre équipe, ainsi que des souches terrestres et aquatiques de collections internationales. Les profils de résistance aux métaux et aux antibiotiques ont été établis pour chaque souche et les gènes impliqués dans la résistance aux métaux : *czcA* participant à l'efflux du Zn, Cd, et Co, *copA* et *copB* participant à l'efflux du Cu et *merA* codant pour la mercurique réductase permettant la résistance au Hg, ont été recherchés par PCR. En ce qui concerne *S. maltophilia*, l'étude a été réalisée sur des souches isolées des sites de Feucherolles et Pierrelaye (France), de Nabeul (Tunisie) et de 3 sites péri-urbains autour de Ouagadougou. Ces sols sont caractérisés par différentes activités agricoles comme l'irrigation avec des eaux usées ou l'utilisation d'amendements organiques, pouvant entraîner diverses contaminations

potentiellement à l'origine de la sélection de résistances. Le site de Feucherolles est caractérisé par l'absence de contaminations. En ce qui concerne le site de Nabeul, les niveaux de contaminations sont également faibles dans les sols toutefois on peut envisager que les eaux usées utilisées pour l'irrigation sont potentiellement contaminées en métaux lourds et que de ce fait la communauté microbienne peut se retrouver en contact avec des métaux lourds. Les sites de Ouagadougou sont caractérisés par une contamination en zinc certainement du fait de l'amendement avec des déchets urbains bruts. Enfin, le site de Pierrelaye (France) se caractérise par une contamination polymétallique importante du fait de l'utilisation des eaux usées de la ville de Paris pendant près d'un siècle. De même que pour *P. aeruginosa*, nous avons testé les capacités de résistance aux antibiotiques et aux métaux de la collection de souches de *S. maltophilia* et recherché la présence de gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux métaux (*copB*, *czcA*, *czcC* et *merA*). Par ailleurs, *S. maltophilia* est caractérisée par un plus grand nombre de résistance intrinsèque aux antibiotiques que *P. aeruginosa*, nous nous sommes donc également intéressés à la présence de gènes potentiellement à l'origine de ces résistances et impliqués dans différents types de mécanismes (efflux : *smeV* ; modification de l'antibiotique : *smlt3652*, *blaL2* ; protection de la cible : *qnr*) de façon à mettre en évidence le rôle de la présence de ces gènes sur les phénotypes de résistances observés.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés de façon plus approfondie au phénomène de co-résistance au mercure et aux antibiotiques et avons cherché à mettre en évidence ce phénomène chez les deux modèles. Les gènes permettant la résistance au mercure sont très souvent positionnés sur des éléments génétiques mobiles de type plasmide, transposon ou îlot génomique sur lesquels ils peuvent être associés à des gènes de résistance aux antibiotiques (Liebert, *et al.*, 1999). L'acquisition de ce type d'élément mobile par transfert horizontal sous la pression mercurique ou antibiotique entraîne alors la double résistance au mercure et aux antibiotiques. Les phénomènes de co-résistance mercure / antibiotiques sont certainement les plus décrits dans la littérature et ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces bactériennes à la fois dans le milieu hospitalier et dans les environnements contaminés, ce qui fait de cette association un bon modèle pour l'étude de la co-résistance métaux / antibiotiques chez des pathogènes opportunistes tels que *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. La présence de différents déterminants positionnés sur des îlots génomiques dans les génomes des souches séquencées de *P. aeruginosa* laisse supposée une diversité intra-spécifique, pouvant s'expliquer par des acquisitions par transfert horizontal. En effet, seule la souche PAO1 ne possède pas d'opéron *merRTPA*, responsable de la résistance au

mercure. Le génome de la souche PA14 contient un opéron homologue à celui présent sur le transposon Tn501. Le génome de PA7 contient 3 opérons *mer* dont un homologue à celui du Tn501, un homologue à celui de l'îlot génomique PAGI-5 (*Pseudomonas aeruginosa* Genomic island) et un partiel homologue à celui trouvé chez *P. stutzeri*. Enfin, le génome de la souche LESB58 contient un opéron *mer* homologue à celui présent sur l'îlot génomique PAGI-2. Le séquençage de la souche clinique K279a de *S. maltophilia* a également révélé la présence d'un opéron *mer* positionné sur un îlot génomique. L'objectif de la deuxième partie de ce chapitre est donc de mettre en évidence des phénomènes de co-résistance mercure / antibiotiques chez *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. Pour cela, la diversité intra-spécifique des déterminants *merA* présents chez les deux modèles a été évaluée. Des profils de restriction ont été établis par digestion des produits PCR obtenus et un représentant de chaque profil a été séquencé. Un arbre phylogénétique a ensuite été réalisé à l'aide du logiciel Seaview 4.2 (pbil, Lyon) à partir des séquences obtenues dans cette étude ainsi que des séquences du gène *merA* présent chez différentes espèces bactériennes (obtenues sur le site NCBI). Enfin, des associations entre déterminants *merA* et les profils de résistances aux antibiotiques ont été recherchées.

Introduction (English version)

P. aeruginosa and *S. maltophilia* are described as ubiquitous bacteria widespread in a large panel of natural and environments impacted by anthropogenic activities, suggesting that they could share the same ecological niches. However, we observed in the previous chapter that the two models were not distributed in the same way in soils. The prevalence of *P. aeruginosa* in soil is low and its presence in the manure suggests that its presence in soil could be more likely the consequence of a secondary intake with amendments or water for irrigation than due to its endemicity in soils. On the opposite, *S. maltophilia* has been highlighted in all investigated soils, supporting the hypothesis of its endemicity in soils.

Despite differences in the prevalence and abundance of the two models in soils, we found that some human activities could positively influence their distribution and numbers. This effect may be direct through the introduction of bacteria present in irrigation water or amendments as manure. In this case, introduced bacteria can present specific antibiotic resistance because animals they come from may have been submitted to antibiotic therapy. The effect can also be indirect and due to the presence of contaminants such as organic molecules or heavy metals, selecting species or strains presenting higher adaptation capacities. The effect of these contaminants in environments impacted by anthropogenic activities on the selection and maintenance of antibiotic resistance has been suggested in various studies (Filali, *et al.*, 2000, Berg, *et al.*, 2005, Matyar, *et al.*, 2008). For instance presence of heavy metal in soils, receivers and accumulators of these toxic compounds and reservoirs of antibiotic resistance genetic determinants, could favour the selection and spread of resistant bacterial population by resistance co-selection phenomena. However, most of the studies investigating these phenomena are conducted at the community level and do not take in account the presence of populations that could present a public health interest as opportunistic bacterial pathogens.

Antibiotic resistance capacities in environmental strains of the two models *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* are poorly studied. Such studies are conducted on few strains, often isolated from particular environments leading to contradictory results. However, antibiotic resistance is considered as a major factor involved in the survival in the hospital and is the subject of numerous studies in clinical strains. These bacteria are intrinsically resistant to a large panel of antibiotic molecules due to its low membrane permeability, the presence of efflux pumps and antibiotic modifying enzymes that are encoded by chromosomic determinants (Sanchez, *et al.*, 2009, Strateva & Yordanov, 2009). These bacteria also have a significant capacity to

acquire resistance either by mutation or by acquisition of plasmids, transposons or integrons by horizontal transfer, leading to the emergence of multidrug-resistant clones (Toleman, *et al.*, 2007, Gould, 2008).

This chapter is divided in two parts. The objective of the first part is to identify environmental factors acting as selective pressure that favour the emergence and maintenance of antibiotic resistance in *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. As presence of heavy metals, even at low or high concentration, could be responsible of heavy metal and antibiotic resistance co-selection, a particular attention has been brought to heavy metal resistance capacity of the models. We evaluated the metal and antibiotic resistance capacity of strains of the two models isolated from environments studied in the previous chapter and compared to those of strains isolated from the hospital (hospital environment, patients and cystic fibrosis individuals) and we investigated the presence of genes involved in resistance by PCR. Work on *P. aeruginosa* was conducted on a collection of environmental strains isolated from soil contaminated by hydrocarbons, copper (vineyard soil) and manure. As the prevalence of *P. aeruginosa* is low in soils, we added to the collection i) strains from aquatic environments, ii) strains isolated from healthy captive snakes characterized by our research group (Colinon *et al.*, 2010), and iii) terrestrial and aquatic strains from international collections. Heavy metal and antibiotic resistance profiles were determined for each strain and genes implicated in heavy metal resistance, *czcA* involved in the efflux of Zn, Cd and Co, *copA* and *copB* involved in the efflux of Cu, and *merA* encoding a mercuric reductase enabling resistance to Hg, have been searched by PCR.

Regarding *S. maltophilia*, the study was realized on strains isolated from the sites of Feucherolles and Pierrelaye (France), Nabeul (Tunisia) and 3 peri-urban sites near Ouagadougou (Burkina Faso). These soils were characterized by different agricultural practices as irrigation with wastewater or organic amendments that could lead to different contaminations, potentially selecting resistances. As for *P. aeruginosa*, we tested the capacity of metal and antibiotic resistance among the collection of *S. maltophilia* strains and investigated heavy metal resistance encoding genes (*copB*, *czcA*, *czcC* and *merA*). Genes potentially involved in resistance to metals and antibiotics have also been investigated by PCR. As *S. maltophilia* is characterized by a higher number of antibiotic resistance determinants than *P. aeruginosa*, we also investigated the presence of antibiotic resistance genes that are implicated in different mechanisms (efflux: *smeV*; antibiotic modification:

smlt3652, *blaL2*; target protection: *qnr*), in order to highlight the role of the presence of these genes on the resistance phenotypes observed.

In the second part of this chapter, we focused on mercury and antibiotic co-resistance and tried to highlight such phenomenon in both models. Mercury resistance genes are often carried on mobile elements like plasmid, transposon or genomic island on which they may be associated with antibiotic resistance genes (Liebert *et al.*, 1999). Acquisition of such element by horizontal transfer under mercury or antibiotic selective pressure leads to both mercury and antibiotic resistance. Mercury and antibiotic co-resistance are probably the most often reported in the literature and were demonstrated in many bacterial species in both the hospital and in contaminated environments, which makes this association a good model for the study of metal and antibiotic co-resistance among opportunistic pathogens. Presence of several determinants on genomic islands in sequenced strains of *P. aeruginosa* suggests a high intra-specific diversity that could be explained by acquisition of these mobile elements by horizontal transfer. The PAO1 strain is the only strain that do not harbour any *merRTPA* operon, responsible of mercury resistance. PA14 genome possesses an operon homologous to the one present on the Tn501 transposon. PA7 genome contains 3 *mer* operons, one homologous to the one present on the Tn501, one homologous to the one present on PAGI-5 (*Pseudomonas aeruginosa* genomic island), and one partial operon presenting homology with the one found in *P. stutzeri*. Finally, the LESB58 genome contains an operon homologous to the one present on PAGI-2. Sequencing of the K279a clinical strain of *S. maltophilia* revealed the presence of one *mer* operon on a genomic island and no *mer* operon was found in the genome of the environmental strain R551-3. The aim of this second part is to look for mercury and antibiotic co-resistance in *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. Intra-specific diversity of *merA* determinants present in both models has been studied. Restriction profiles were established by digesting *merA* PCR products and one to seven representative of each profile was sequenced. A phylogenetic tree was then realised with the Seaview 4.2 software (pbil, Lyon) with *merA* sequences obtained in this study and *merA* sequences from different bacterial species (obtained from the NCBI website). Association between *merA* determinants and antibiotic resistance profiles were also investigated, especially the ones that concern PAGI-2 genomic island of *P. aeruginosa*.

Partie 1 : Diversité de résistance aux métaux et aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* en fonction de l'origine des souches et des pressions de sélection

Part 1: Heavy metal and antibiotic resistance diversity in *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* depending on their origin and selective pressure

“Antibiotic and heavy metal resistance among hospital and environmental strains of *Pseudomonas aeruginosa*”

Amélie Deredjian, Céline Colinon, Elisabeth Brothier, Sabine Favre-Bonté, Benoit Cournoyer, and Sylvie Nazaret*

Université de Lyon, France; Research Group on « Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment », UMR 5557 Ecologie Microbienne, CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, and Université Lyon 1, France.

Short running title: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic, heavy metal, resistance, selective pressure

* Corresponding author. Mailing address: UMR 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, Mendel Bldg., 5th Floor, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. Phone: 33 (0) 4 72 43 13 24. Fax: 33 (0) 4 26 23 44 68. E-mail: nazaret@biomserv.univ-lyon1.fr.

ABSTRACT

Antibiotic resistance capacity of *Pseudomonas aeruginosa* is a major factor implicated in its success as an opportunistic pathogen. The intensive use of antimicrobial compounds in hospital acts as a selective pressure for the emergence of resistant strains. Whether the non hospital environment offers such favourable conditions, irrespective of antibiotic presence, is not well documented. Here we investigated the antibiotic and heavy metal resistance capacities of a collection of 130 strains of *P. aeruginosa* from various environmental (soils, water, animals) and hospital (environment, patients, CF individuals) origin in order to evaluate niches and selective pressures that favour antibiotic resistance acquisition and maintenance. Most of the 76 environmental strains showed the wild type antibiotic resistance phenotype, i.e. resistance to minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. On the opposite, 60 % of hospital strains presented a multi-resistance phenotype (3 to 16 antibiotics), suggesting that presence of high antibiotic concentrations is the major selective pressure responsible of the selection and maintenance of antibiotic resistance in *P. aeruginosa*. However, 12 % of environmental strains submitted to antiseptics and hydrocarbons in their original niches possessed particular resistance phenotypes, suggesting that contaminations due to anthropogenic activities could lead to antibiotic resistance selection. Regarding heavy metal resistance, environmental strains were more frequently resistant to zinc and cadmium, despite the presence of implicated genes in all the strains, since hospital strains were more frequently resistant to mercury and copper. No association between antibiotic and heavy metal resistances were seen. On the opposite the most resistant strains to antibiotics were the least resistant to heavy metals and inversely.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa, a metabolically versatile Gram-negative bacterium, is capable to adapt to and colonize a wide range of environments. It is present in aquatic and wet ecosystems such as river (Pellett, *et al.*, 1983), bottled mineral water (Hunter, 1993), open ocean (Khan, *et al.*, 2007), wastewater (Schwartz, *et al.*, 2006), and can be isolated from various terrestrial environments including soils from agricultural lands, hydrocarbon impacted sites (Green, *et al.*, 1974, Deziel, *et al.*, 1996), and plant roots (De Meyer & Hofte, 1997).

P. aeruginosa also emerged as a major opportunistic human pathogen and is a common cause of nosocomially-acquired infections partly due to its resistance to antibiotics (Kerr & Snelling, 2009). It is associated to infections among burnt victims, artificially ventilated individuals (McManus, *et al.*, 1985, Richard, *et al.*, 1994), catheterized-patients and cystic fibrosis patients (Foweraker, 2009). Infections in healthy individuals can occur as keratitis, dermatitis (Dart, 1988) and otitis (Reid & Porter, 1981). This bacterium can be detected in human and animal fecal samples (Lavenir, *et al.*, 2008, Colinon, *et al.*, 2009) and has been identified as an animal pathogen responsible of ocular infections in dogs (Ledbetter, *et al.*, 2009), and as an occasional cause of bovine mastitis (Osborne, *et al.*, 1981).

P. aeruginosa is characterized by an innate resistance to a wide variety of antimicrobial agents. Its low outer membrane permeability and expression of a number of broadly-specific multidrug efflux (Mex) systems (Morita, *et al.*, 2001, Lambert, 2002, Fajardo, *et al.*, 2008, Strateva & Yordanov, 2009) contribute to the resistance. The strains can also acquire multi-resistance to antibiotics through horizontal gene transfer (Alonso, *et al.*, 1999). Plasmids, transposons and integrons mediated antibiotic resistance genes are increasingly found in *P. aeruginosa* clinical isolates (Gould, 2008, Strateva & Yordanov, 2009). The intensive use of antibiotics in the hospital influences the development and spread of resistance among clinical strains (Alonso *et al.*, 1999; Gould, 2008). Other selective pressures might also favour the acquisition of antibiotic resistance such as the use of antiseptics or quaternary ammonium. Resistance to these compounds is often present on mobile elements with other antibiotic resistance genes (Heuer, *et al.*, 2004, Colinon, *et al.*, 2007) and their use may select both resistances (Bischoff, *et al.*, 2005). Similarly, antibiotic resistance can be co-selected with resistance to heavy metals. Exposure to low concentration of zinc eluted from siliconized latex urinary catheters was shown to induce resistance to the carbapenem-class antibiotic imipenem in *P. aeruginosa* through the repression of the OprD porine and then the influx of this antibiotic (Conejo, *et al.*, 2003, Perron, *et al.*, 2004). The CzcR/CzcS two-component

system was found to co-regulate resistance to both zinc and imipenem. It was further shown that copper is able to induce imipenem resistance through a similar co-regulation mechanism involving the CopR-CopS two-component system (Caille, *et al.*, 2007). These observations suggested that various chemicals in the hospital might contribute to maintain a selective pressure for antibiotic resistance.

In the environment (i.e. outside the hospital), the presence of antibiotics, consecutive to the release from microbial antibiotic producers or from human activity (i.e. agricultural use, waste water treatment plant system), can act as a selective pressure leading to the occurrence of resistance within indigenous bacterial populations (Martinez, 2009). It is also known that selection of antibiotic resistance determinants might occur by means of chemical or heavy metal pollution. For instance, antibiotic resistant bacteria are often found in polluted ecosystems, such as wastewater or hydrocarbon impacted environments (Filali, *et al.*, 2000, Berg, *et al.*, 2005, Matyar, *et al.*, 2008). In these environments, high antibiotic resistance level is often associated to heavy metal resistance. In a recent survey of the occurrence of *P. aeruginosa* in hydrocarbon-contaminated sites, Kaszab *et al.* (2010) showed that multidrug-resistant isolates were widespread in these ecosystems. However, the molecular mechanisms and the selective pressure responsible of antibiotic resistance in the isolates were not investigated. Since heavy metals are often associated to hydrocarbons, one could expect that their presence may act as a selective pressure in hydrocarbon-contaminated environments.

Our objectives were to conduct an exploratory study to identify niches and selective pressures that could favour the emergence of antibiotic resistance in environmental isolates of *P. aeruginosa*. Our strategy was based on the antibiotic susceptibility testing of environmental and clinical strains which were chosen on their expected past exposure to selective pressure (from low to high antibiotic or antiseptic use, hydrocarbons, heavy metals). A set of 76 environmental *P. aeruginosa* strains from manure, water, snakes and soil, 29 hospital strains and 25 strains from CF patients selected in international collections and our own collection were analysed. As antibiotic resistance is often linked with heavy metal resistance and as heavy metals could act as selective pressure at low or high concentration both inside and outside the hospital, we evaluated heavy metal susceptibility and searched for the presence of heavy metal resistance genes (*czcA copA*, and *merA* involved in cadmium and zinc, copper, and mercury resistance, respectively).

MATERIALS AND METHODS

Strains

A collection of 130 strains of *P. aeruginosa* was used in this study (Table 5). These strains were chosen taking into account their origin and the putative anthropogenic selective pressure (i.e. antibiotics, antiseptics, hydrocarbons, heavy metals) present in their original niche.

Environmental strains (76 isolates from outside the hospital) formed 3 groups. The first group was composed of strains isolated from water: 3 strains from natural water (international collections) and 14 strains from a wastewater treatment plant system, Montracol France (BPOE collection). The second group was composed of strains isolated from soil related samples: 12 strains from plants (international collections), 3 strains from vineyard soils (BPOE collection), 16 strains from hydrocarbon impacted sites (international and BPOE collections), 5 strains from manure (BPOE collection) and 2 strains from animal feces (international and BPOE collections). The third group was composed of 13 strains isolated from snake breedings (healthy snake feces, cages, feeding...) (BPOE collection) (Colinon *et al.*, 2010). The 54 strains from the hospital were also divided in 3 groups. The first group was composed of strains isolated from the hospital environment: 10 strains from the water system and 6 strains from aeration grids (Long stay care unit of the Hospices Civils de Lyon (HCL), Lyon France, BPOE collection) (Lavenir *et al.*, 2008). The second group was composed of strains isolated from patients: 5 strains from carrier patients (HCL, Lyon France, BPOE collection) and 8 strains from infected patients (HCL, Lyon France, BPOE collection and international collections). The third group was composed of 25 strains isolated from French cystic fibrosis individuals (BPOE collection). Strains originating from the wastewater treatment plant, the snake breedings, and the HCL hospital were chosen based on their belonging to different clonal complexes as previously defined by PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) *SpeI* typing method (Lavenir, ph thesis, unpublished data; Lavenir *et al.*, 2008; Colinon *et al.*, 2009, unpublished data). Other strains were chosen taking into account their different origins, increasing the diversity of the studied collection, based on literature data.

Table 5. Strains of *P. aeruginosa* isolated from environment and hospital.

Origin	Name	Details	Supposed selective pressure *	References
Environment				
Water	Natural water	LMD2527 (Ew1), LMG2107 (Ew2), LMG9009 (Ew3)	International collections	Low concentration of antibiotics, disinfectants,
	Waste water	poe1033 (Ew4), poe1108 (Ew5), poe1028 (Ew6), poe1314 (Ew7), poe1091 (Ew8), poe1062 (Ew9), poe1312 (Ew10), poe1045 (Ew11), poe1026 (Ew12), poe1372 (Ew13), poe1436 (Ew14), poe1150 (Ew15), poe1081 (Ew16), poe1302 (Ew17)	Waste water treatment plant, Montracol (France)	heavy metals Lavenir <i>et al.</i> , 2007
Soil related	Plant related	ATCC14425 (Es1), CFBP5031 (Es2), CFBP5032 (Es3), CFBP5033 (Es4), CFBP5034 (Es5), LMG5031 (Es6), LMG5032 (Es7), LMG5033 (Es8), LMG1272 (Es9), LMG6855 (Es10), CFBP2466 (Es11), CFBP5035 (Es12)	International collections	Antibacterial compounds due to plant and microorganism production
	Soil	ATCC21776 (Es13), ATCC31479 (Es14), CIP104590 (Es15), LMD5034 (Es16), LMD68.7 (Es17), LMG15153 (Es18), 7NSK2 (Es19), DSMZ6195 (Es20)	International collections	Antibiotics due to producer microorganisms
	Vineyard	bpoel457 (Es21), bpoel459 (Es22), bpoel460 (Es23)	Vineyard amended with mushroom manure, Burgundy (France)	Copper contamination
	Hydrocarbon impacted soil	bpoel428 (Es24), bpoel429 (Es25), bpoel430 (Es26), bpoel431 (Es27), bpoel432 (Es28), bpoel433 (Es29), bpoel444 (Es30), bpoel445 (Es31), bpoel447 (Es32), bpoel454 (Es33), bpoel464 (Es34), bpoel465 (Es35), bpoel466 (Es36)	Hydrocarbon impacted, Lorraine and Ile de France (France)	Hydrocarbons, heavy metal contamination
		CFBP5036 (Es37), CFBP5037 (Es38), ATCC33988 (Es39)	Hydrocarbon impacted sites International collections	
	Manure	bpoel461 (Es40), bpoel462 (Es41), bpoel474 (Es42), bpoel475 (Es43), bpoel479 (Es44)	Horse manure	Antibiotic treatment
	Animals	ATCC27014 (Es45)	International collections	No known exposure
		bpoel463 (Es46)	Elk, Park of Bandia (Senegal)	

Snake breedings		bpoe602 (Esb1), bpoe626 (Esb2), bpoe636 (Esb3), bpoe639 (Esb4), bpoe688 (Esb5), bpoe690 (Esb6), bpoe674 (Esb7), bpoe700 (Esb8), bpoe701 (Esb9), bpoe603 (Esb10), bpoe612 (Esb11), bpoe692 (Esb12), bpoe600 (Esb13)	Healthy captive snakes, (France)	Disinfectants	Colinon <i>et al.</i> , 2009
Hospital					
Environment	Water	poe9 (He1), poe92 (He2), poe110 (He3), poe101 (He4), poe22 (He5), poe45 (He6), poe59 (He7), poe17 (He8), poe1 (He9), poe2 (He10)	Water system, H. Hospices civils de Lyon (France)	Indirect antibiotic pressure	Lavenir <i>et al.</i> , 2008
	Aeration grids	poe81 (He11), poe30 (He12), poe103 (He13), poe77 (He14), poe64 (He15), poe131 (He16)	Aeration grids, Hospices Civils de Lyon, Lyon (France)		Lavenir <i>et al.</i> , 2008
Patients	Human carriage	poe73 (Hp1), poe8 (Hp2), poe19 (Hp3), poe54 (Hp5), poe51 (Hp6)	Rectal swabs, Hospices Civils de Lyon, Lyon (France)	Direct antibiotic pressure	Lavenir <i>et al.</i> , 2008
	Infections	poe126 (Hp7)	Patients, Hospices Civils de Lyon, Lyon (France)		Lavenir <i>et al.</i> , 2008
		ATCC15691 (Hp8), ATCC27853 (Hp9), PA5 (Hp10), PA6 (Hp11), PA12 (Hp12), PA14 (Hp13), PAO1 (Hp14)	International collections		
Cystic fibrosis individuals	Cystic fibrosis	bpoe977 (Hcf1), bpoe979 (Hcf2), bpoe980 (Hcf3), bpoe981 (Hcf4), bpoe982 (Hcf5), bpoe983 (Hcf6), bpoe984 (Hcf7), bpoe5000 (Hcf8), bpoe5001 (Hcf9), bpoe5002 (Hcf10), bpoe5003 (Hcf11), bpoe5004 (Hcf12), bpoe5005 (Hcf13), bpoe5006 (Hcf14), bpoe5007 (Hcf15), bpoe5008 (Hcf16), bpoe5009 (Hcf17), bpoe5010 (Hcf18), bpoe5011 (Hcf19), bpoe5012 (Hcf20), bpoe5013 (Hcf21), bpoe5014 (Hcf22), bpoe5015 (Hcf23), bpoe5016 (Hcf24), bpoe5017 (Hcf25)	France	Heavy and long-term direct antibiotic pressure	

Names in brackets are used in the dendrogram

* Supposed selective pressures were determined according to the literature.

Antibiotic resistance test

The *in vitro* antimicrobial susceptibilities of *P. aeruginosa* were routinely determined using the VITEK 2 system with a card (NO93) permitting to establish antibiotic resistance profile of non fermenting gram negative bacteria (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) following recommendations of the manufacturer. Briefly, a suspension was prepared from a 24h pure culture realised on TSA (Tryptic Soy Agar) in a saline solution (NaCl₂ 0.4 %) in order to reach an optical density between 0.50 and 0.63 McFarland. Then, 145 µL of this suspension was added to a new 3 ml saline solution (NaCl₂ 0.4 %). This suspension was adsorbed by capillarity on the card. Minimal inhibitory concentrations were then determined by measuring growth at different points during the incubation and comparing it in control and antibiotic supplemented wells. Minimal inhibitory concentrations of 18 antibiotics [ticarcillin (TIC 16, 32, 64 µg/ml), ticarcillin-clavulanic acid (TIM 8/2, 32/2, 64/2 µg/ml), piperacillin (PIP 4, 16, 64 µg/ml), piperacillin-tazobactam (TZP 4/4, 16/4, 128/4 µg/ml), ceftazidim (CAZ 1, 2, 8, 32 µg/ml), cefepim (FEP 2, 8, 16, 32 µg/ml), aztreonam (ATM 2, 8, 32 µg/ml), imipenem (IPM 2, 4, 16 µg/ml), mereopenem (MEM 0.5, 4, 16 µg/ml), amikacin (AMK 8, 16, 64 µg/ml), gentamicin (GEN 4, 16, 32 µg/ml), isepamicin (ISP 4, 8, 32 µg/ml), tobramycin (TOB 8, 16, 64 µg/ml), ciprofloxacin (CIP 0.5, 2, 4 µg/ml), pefloxacin (PEF 0.5, 2, 8 µg/ml), colistin (CS 4, 16, 32 µg/ml), minocyclin (MIN 2, 4, 8 µg/ml), trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT 0.5/9.5, 2/38, 16/304 µg/ml)] were determined.

Heavy metal resistance profiles

Heavy metal resistance of *P. aeruginosa* strains were established using TSA medium diluted 10 fold (TSA 1/10) supplemented with 5, 10, 20, 50 mM of Zn²⁺ (ZnCl₂), 0.5, 1, 2, 5 mM of Cu²⁺ (CuCl₂), 0.6, 1.25, and 2.5 mM of Cd²⁺ (CdCl₂), 10 and 50 µM of Hg²⁺ (HgCl₂). Preliminary tests were done in order to define the suitable concentrations. Two strains PAO1 and ATCC15691 were used as control for each manipulation. A suspension was realised from a 24h pure culture on TSA 1/10 in a saline suspension (NaCl₂ 0.8 %). One hundred µL of the suspension was inoculated on the supplemented and non supplemented TSA1/10 plates. Cultures were incubated at 28°C up to seven days. A strain was considered as resistant when growth on medium supplemented with metal was equivalent of growth on medium without metal. When growth was lower, the resistance was intermediate. When no growth was obtained, the strain was considered as sensitive. Experiments were repeated twice.

Data analysis

The phenotypic data from antibiotic and heavy metal resistance testing were encoded either as 0 (sensitivity), 1 (intermediate) or 2 (resistance). Euclidian distance between strains were computed and subjected to hierarchical cluster analysis using the agglomerative second order moment algorithm known as Ward's method (Thioulouse & Lobry, 1995) to produce the dendrograms.

Heavy metal resistance gene amplification

The primers used in this study are summarized in Table 6. The *copA*, *copB* and *czcA* primers specific to *P. aeruginosa* were designed by Bouskil and colleagues (Bouskil, *et al.*, 2007) and PCR conditions were as discussed by the authors. Degenerated primers were designed in order to amplify a broad range of *merA* genes (encoding mercuric reductase) from Gram negative bacteria (Ranjard, ph thesis, unpublished data). These primers were obtained by sequence alignment of *merA* genes of Gram negative bacteria available. The following PCR cycle was used to amplify a 933 bp segment of *merA* (total size 1686 pb): an initial denaturation step is done at 94°C during 4 min. This first step is followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min of primer annealing at 57°C, 1 min of primer extension at 72°C. Finally, a final extension was done during 8 min at 72°C.

Table 6. PCR primers used for screening heavy metal resistance genes.

ORF	Function	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Product size bp	Annealing temperature °C	References
<i>copA</i>	copper-transporting P-type ATPase	GAAATAGCTCATTGCCGAGGCGTT	CGGTCTCTACGAATACCGCTTCAA	475	55	Bouskil <i>et al.</i> , 2007
<i>copB</i>	copper-linking protein	GGTTGGTCAACAGGATGTCGTA	TTCCTGCTCGACCAGTTGGAATAC	364	58	Bouskil <i>et al.</i> , 2007
<i>czcA</i>	divalent metal cation efflux transporter	ACAGGTTGCGGATGAAGGAGATCA	GTTACCTTGCTCTTCGCCATGTT	206	56	Bouskil <i>et al.</i> , 2007
<i>merA</i>	Mercuric reductase	GTGCCGTCCAAGATCATGAT	TAGCCYACRGTSGCSACYTG	933	57	This study

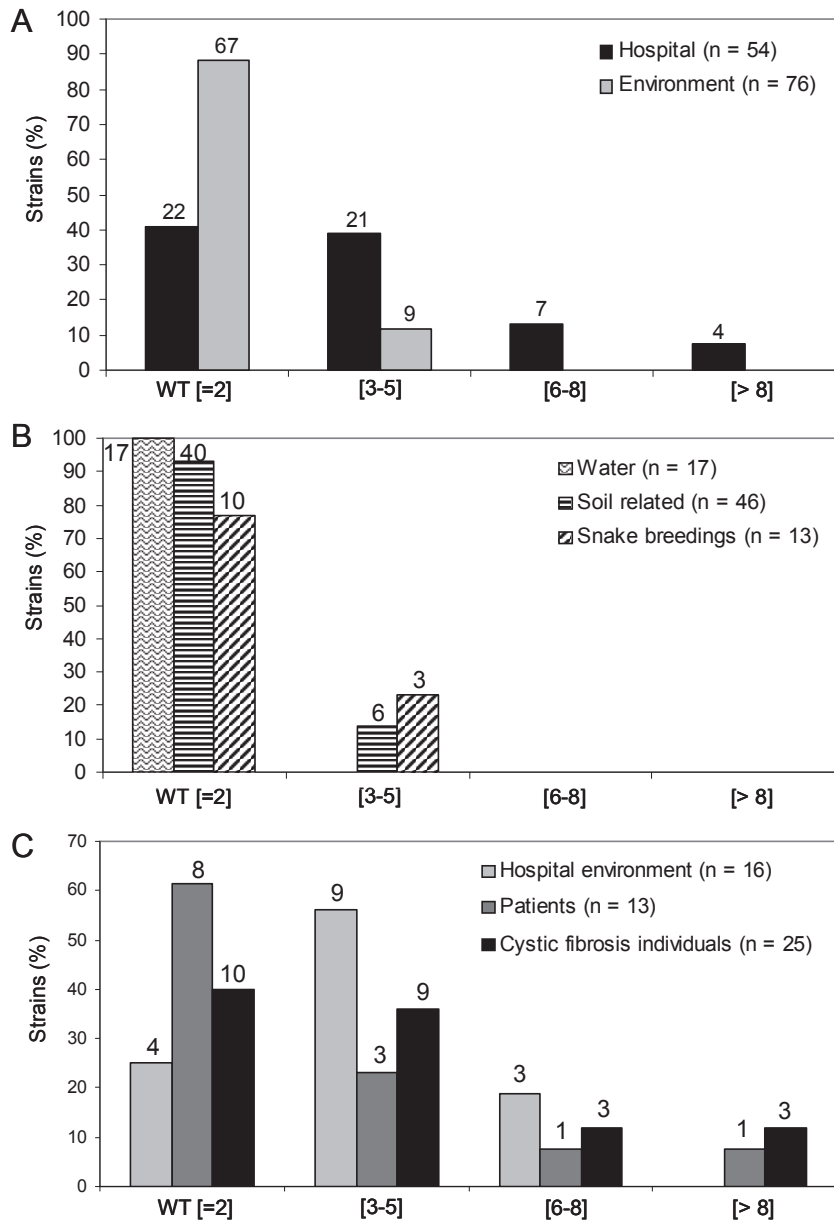


Figure 28. Antibiotic multi-resistance in 76 environmental and 54 hospital strains of *P. aeruginosa* (A), within environmental strain sub-groups (B) and hospital strain sub-groups (C).

Effectives are indicated above bars; n = number of strains in each category; WT = Wild Type; [] = number of antibiotics.

RESULTS

Antibiotic resistance profiles

The antimicrobial susceptibility of the 130 *P. aeruginosa* strains was tested. Like the wild-type (WT), all the strains (100%) were resistant to minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole and sensitive to colistin. Eighty-nine percent of the 76 strains with an environmental origin presented the WT antibiotic resistance phenotype of *P. aeruginosa* whereas 41 % of the 54 strains with a hospital origin showed the WT phenotype. The non-WT environmental strains had 1 to 3 additional resistances whereas hospital ones could resist to more than 8 antibiotics (Figure 28A). Whereas environmental strains presented resistance to only 6 out of the 15 antibiotics (Figure 29B) resistance to all antibiotics was observed within the hospital group (Figure 29C).

Within each group differences in antibiotic resistance levels with regard to the number of antibiotics (Figure 28A) and the type of antibiotics (Figure 29A) were observed. Within the environmental group (Figure 28B), all the strains from water showed the WT phenotype, with no additional resistance. Strains from snake (23 %) and soil related (14 %) origin showed resistance up to 5 antibiotics (Figure 28B). Resistances to ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid (penam), imipenem (carbapenem), and pefloxacin (quinolone) were observed among soil related strains (Figure 29B). Resistance to ticarcillin and ticarcillin-clavulanic acid was observed in 2 strains from hydrocarbon impacted site, 2 from plants and 2 from soil. Imipenem resistance was observed in one strain from hydrocarbon impacted site and pefloxacin resistance was observed in 1 strain from soil. Resistance to gentamicin and tobramycin was only observed in 3 strains isolated from the snake breeding group (Figure 29B).

Within the hospital group, 25%, 62% and 40% of the strains from the hospital environment, the patients and the CF individuals, respectively had the WT resistance phenotype (Figure 28C). Eight % and 12 % of strains from patients and from CF individuals were resistant to more than 8 antibiotics (Figure 28C), respectively and one CF strain had the particularity of being resistant to all tested antibiotics (Figure 29C). Among strains from patients, no resistance was observed for 5 antibiotics, i.e. ceftazidim, cefepim, aztreonam, meropenem and amikacin and no dominant resistance phenotype was observed. Among strains from the hospital environment, no resistance was observed for 6 antibiotics i.e. piperacillin-tazobactam, ceftazidim, cefepim, aztreonam, meropenem and tobramycin and resistances to imipenem and pefloxacin were the most frequent i.e. 37 % of resistant in this group (Figure

29C). Resistances to gentamicin and pefloxacin were the most frequent among strains isolated from CF individuals, representing 36 % and 48 % of the strains of this group, respectively (Figure 29C).

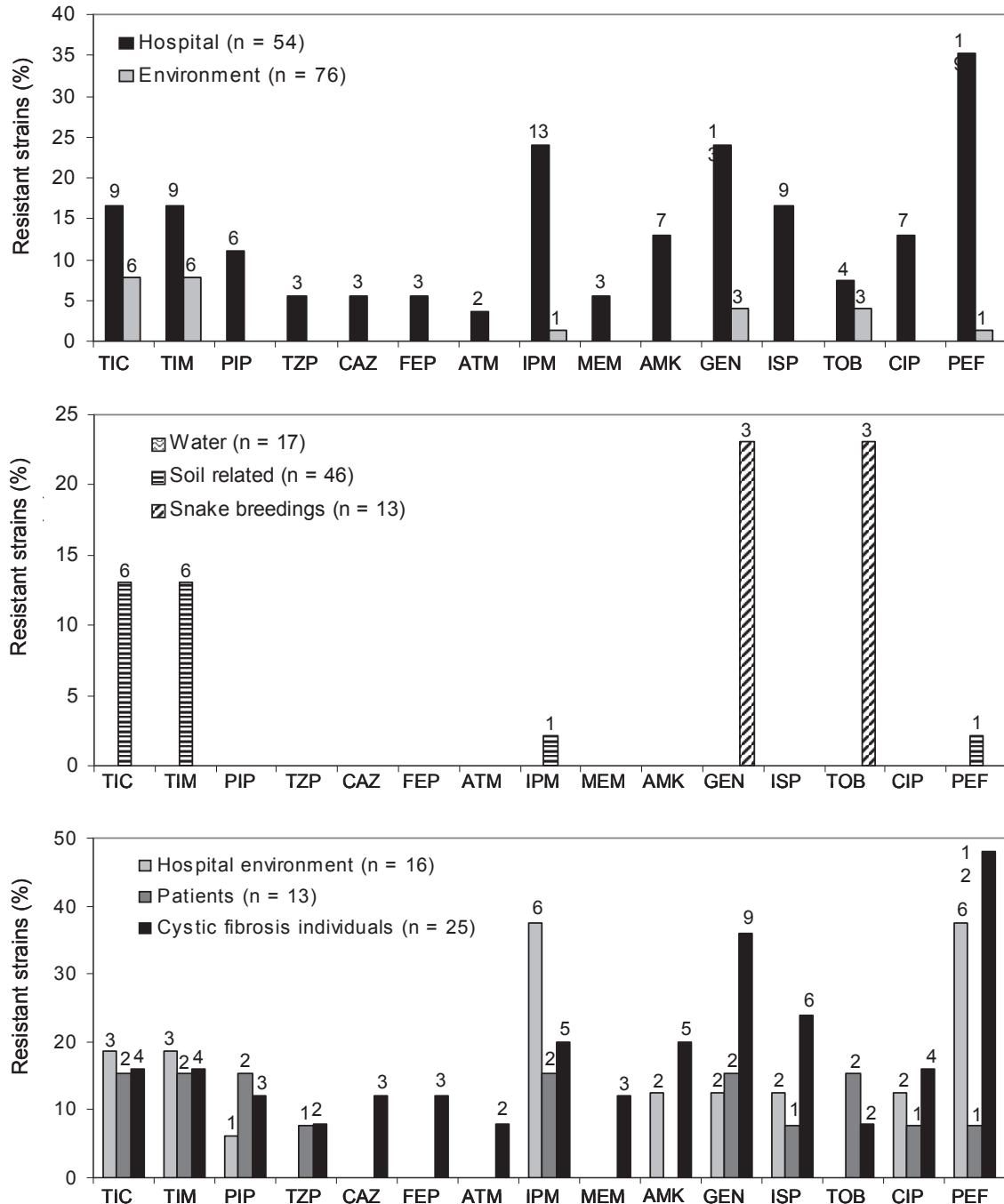


Figure 29. Antibiotic resistance profiles in environmental and hospital strains of *P. aeruginosa* (A), within environmental strain sub-groups (B) and hospital strain sub-groups (C). Effectives are indicated above bars; n = number of strains in each category; TIC = Ticarcillin, TIM = ticarcillin-clavulanic acid, PIP = piperacillin, TZP = piperacillin-tazobactam, CAZ = ceftazidim, FEP = cefepim, AZT = aztreonam, IPM = imipenem, MEM = mereopenem, AMK = amikacin, GEN = gentamicin, ISP = isepamicin, TOB = tobramycin, CIP = ciprofloxacin, PEF = pefloxacin.

Heavy metal resistance

Differences in heavy metal resistance were observed between and within the 2 groups of strains both toward the type of the heavy metal and the concentrations of the heavy metal (Figure 30). In environmental strains, we found strains able to grow in the presence of heavy metal at concentrations up to 20 mM of Zn^{2+} , 0.5 mM of Cu^{2+} , 1.25 mM of Cd^{2+} and 10 μM of Hg^{2+} . Within the hospital group strains were able to grow on the same concentrations of Zn^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} but some strains were found resistant to higher concentrations of Cu since they grow on 1 or 2 mM of Cu^{2+} (Figure 30A). None of the strains irrespective of their origin were able to grow in the presence of the highest concentrations tested i.e. 50 mM of Zn^{2+} , 5 mM of Cu^{2+} , 2.5 mM of Cd^{2+} and 50 μM of Hg^{2+} . Regarding the hospital strains, within each sub-group, a fewer number of strains were resistant to heavy metals, especially Zn^{2+} and Cd^{2+} , compare to environmental sub-group (Figure 30B and C). On the opposite a higher number of strains were able to grow on 10 μM of Hg^{2+} . Among environmental strains, those isolated from snake breedings were the least resistant since no resistance was observed for Zn^{2+} and Hg^{2+} and only 30 % of them showed resistance to the lowest concentrations of Cd^{2+} and Cu^{2+} (0.5 and 0.6 mM, respectively) (Figure 30B). On the opposite strains from water and soil related samples were resistant to all the tested metals. Resistance to Cu^{2+} was only observed at the lowest concentration (0.5 mM) but most of these strains were able to grow in presence of this concentration, 94 % and 100 % of strains from water and soil related samples, respectively. Concerning Zn^{2+} , 65 % and 29 % of the strains isolated from water were resistant to 5 and 10 mM of Zn^{2+} , respectively. About 83 %, 76 % and 30 % of strains from soil related samples were resistant to 5, 10 mM and 20 mM of Zn^{2+} . Concerning Cd^{2+} , 71 % and 53 % of the strains from water and 72 % and 33 % of the strains from soil related samples were able to grow in the presence of 0.6 and 1.25 mM of Cd^{2+} , respectively. Resistance to Hg^{2+} was the least distributed among environmental samples with less than 20 % of the strains from water and soil related samples resistant to 10 μM of Hg^{2+} (6 % and 17 %, respectively). Among hospital strains those isolated from the CF individuals were the least resistant to heavy metals (Figure 30C). Whatever the metal and the concentration, a few of them were able to grow. On the opposite the highest proportion of resistant strains were mostly observed among those isolated from patients. Notably, the percentage of resistant strains isolated from CF patients did not reach up to 25 % while the percentage of resistant strains from the hospital environment and patients frequently reached up 50 %.

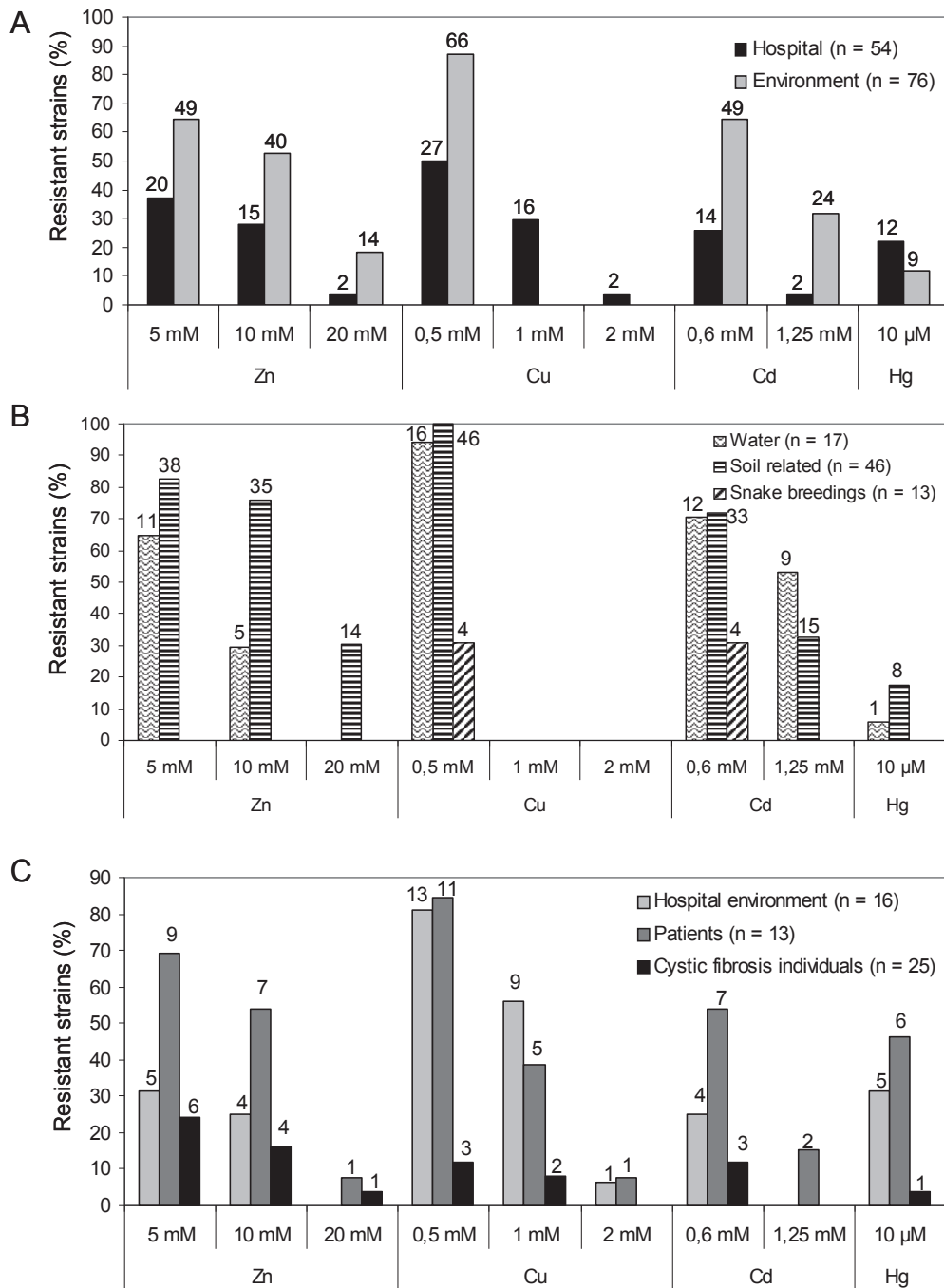


Figure 30. Heavy metal resistance in environmental and hospital strains of *P. aeruginosa* (A), within environmental strain sub-groups (B) and strain hospital sub-groups (C). Effectives are indicated above bars; n = number of strains in each category.

Concerning Zn^{2+} , 31 %, 69 % and 24 % of strains from the hospital environment, from patients and from CF individuals were able to resist to 5 mM of Zn^{2+} ; 25 %, 54 % and 16 % were resistant to 10 mM of Zn^{2+} , respectively. Only strains from patients and CF individuals were resistant to 20 mM (8 % and 4 %, respectively). Concerning Cd^{2+} , 25 %, 54 % and 12 % of strains isolated from the hospital environment, from patients and from CF individuals were resistant to 0.6 mM of Cd^{2+} . Only 15 % of strains from patients showed resistance to 1.25 mM. Mercury resistance was more frequent in strains from the hospital environment and from patients (31 % and 46 %, respectively) than in strains from CF individuals.

Strains similarity based on antibiotic and heavy metal resistance

The dendrogram differentiated 3 major groups (Figure 31). One group was composed of strains presenting multi-resistance to antibiotics. This group was composed of 32 strains including 28 from the hospital (14 from CF individuals, 5 from patients, 9 from the hospital environment) and 4 from the environment (3 from snake breedings presenting aminoglycoside resistance and 1 from soil). A second group was composed of strains presenting low resistance to antibiotics but high heavy metal resistance. This group contained 42 strains. Among these strains, only one was isolated from the hospital (PAO1). Other strains were isolated from water (11) and from soil related samples (30). A third group was composed of 56 strains with intermediate level of resistance, 25 from the hospital (11 from CF isolates, 7 from patients, 7 from the hospital environment), 31 from the environment (10 from snake breedings, 15 from soil related samples, 6 from water). Among the group of strains exhibiting resistance toward antibiotics and heavy metals no systematic association between antibiotic resistance and heavy metal resistance were seen.

Presence of heavy metal resistance genes

The presence of the heavy metal resistance encoding genes *copA*, *copB*, *czcA* and *merA* was determined by PCR using specific primers. These genes are present in the 4 sequenced genomes of *P. aeruginosa* strains PAO1, PA14, PA7 and LESB58, except *merA* which is absent in the genome of PAO1. On the genomes the complete resistance operons were present. Positive amplification signals were obtained for *czcA*, *copA* and *copB* for all the tested strains (whatever their origin and their resistance phenotype). On the opposite, *merA* gene was only detected in 33 % of strains (Table 7).

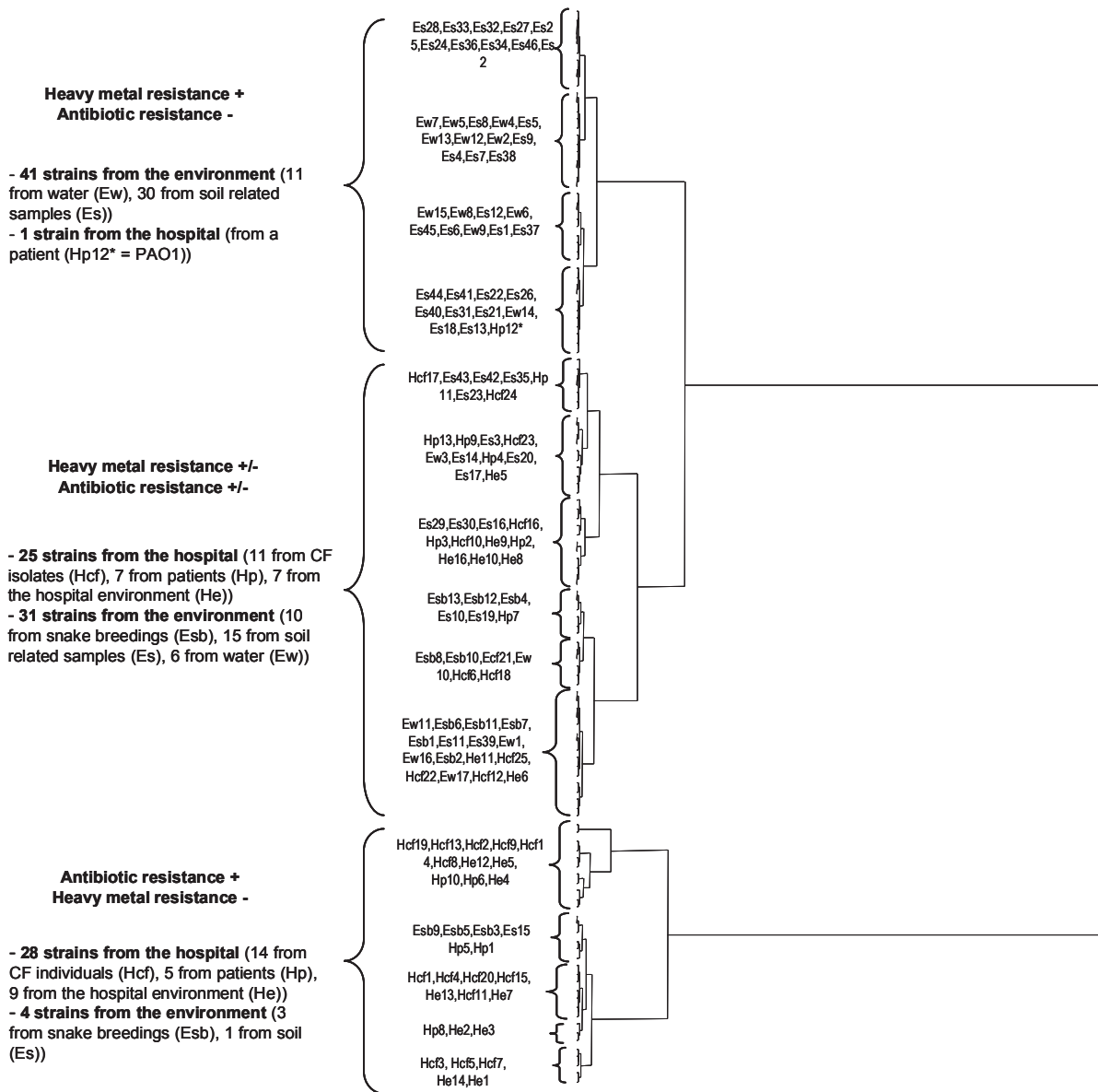


Figure 31. Dendrogram showing the relationships between *P. aeruginosa* strains based on antibiotic and heavy metal resistance data. The 130 strains analysed are presented in Table 5.

We showed that *merA* was more frequently detected among strains from the hospital environment (100 %) and from patients (77 %) than in other strains; 29 % of strains isolated from water, 28 % from CF patients, 21% from snake breedings, and 15 % from soil related samples (Table 7). Whereas all strains from the hospital that showed a mercury resistant phenotype had a *merA*-like gene, 6 strains from soil related samples had the resistant phenotype but no detectable *merA*-like gene. Similarly several strains from both environmental and hospital origin showed a positive *merA* amplification signal but were not able to grow on 10 μ M of Hg²⁺.

Table 7. Mercury resistance phenotype and genotype.

	Hospital		Environment			
	Environment	Patients	CF individuals	Water	Soil related	Snake breedings
Strains growing in presence of 10 μ M Hg ²⁺	31,25 % (5/16)	46,15 % (6/13)	4 % (1/25)	5,88 % (1/17)	17,39 % (8/46)	0 % (0/13)
Strains with a <i>merA</i> -like gene	100 % (16/16)	76,92 % (10/13)	28 % (7/25)	29,41 % (5/17)	15,38 % (2/13)	21,43% (3/14)

DISCUSSION

Understanding the role of environmental factors on the selection of antibiotic resistance among *P. aeruginosa* is an important issue to better control and to define the risk associated to the dissemination of resistant strains. In the current work, we explored the relationship between antibiotic resistance of *P. aeruginosa* strains and selective pressure in their original niche. The analysis of antibiotic susceptibility profile clearly showed that antibiotic resistant phenotype (i.e. different to the WT profile) was more frequently encountered among strains from the hospital, than among strains from the environment (Figure 28). Furthermore hospital strains were more frequently multi-resistant to more than 6 antibiotics (Figures 28C and 29C) and resistance to all type of antibiotics was found. These differences between the two groups of strains were expected since exposition to a wide range of antibiotics and to high antibiotic

concentrations are more likely to occur in the hospital than in the environment. Studies aiming at comparing the widespread of antibiotic resistance among hospital and environmental *P. aeruginosa* strains are usually conducted on a large set of hospital strains and a small set of environmental strains and gave rise to various conclusions. For instance, Khan *et al.* explored the antibiotic resistance capacities of strains from open ocean. These strains were only able to resist to 6 of the 22 tested antibiotics (Khan, *et al.*, 2007) whereas strain from their clinical set resist to all tested antibiotic. In the same way, Lambert *et al.* showed that environmental strains from industrial sites were less resistant to antibiotics and biocides than clinical strains (Lambert, *et al.*, 2001). On the opposite, the study of Alonso *et al.* showed that environmental strains presented similar antibiotic resistance properties than clinical ones (Alonso, *et al.*, 1999). However, in the former, only 7 environmental strains were used and most of them (6/7) were isolated from oil impacted sites, a particular ecosystem where microbial community frequently showed antibiotic resistance. Otherwise, a recent study recently highlighted the multi-resistance capacity of strains isolated from hydrocarbon impacted sites, presenting similar resistance capacity than clinical strains (Kaszab, *et al.*, 2009).

These comparative studies are difficult to handle first due to the design of the strain set. Collecting strain from hospital origin is easy due to important existing collections worldwide. Furthermore data describing the context of the isolation i.e. type of infection, patient, antibiotic treatment, can be easily obtained. Addition of strains from various niches within the hospital can also be easily performed. However, completing the set with a collection of strains originating from various niches outside the hospital is more complicated first due to the lower number of such strains in the international collections as well as from the less widespread and abundance of this species in some ecosystems i.e. terrestrial ones for instance (Deredjian *et al.*, submitted).

Although antibiotic resistance was greater among the hospital strains than among the environmental ones differences within each group were also observed. Surprisingly, prevalence of resistance was higher in the hospital environmental strains and a higher number of multi-resistance strains were observed among these strains than among the patient ones (Figures 28C and 29C). These results were unexpected since different studies showed that strains isolated from the hospital environment were less resistant to antibiotics than strains isolated from patients even in the same hospital (Orsi, *et al.*, 1994, Ruiz, *et al.*, 2004). Nevertheless, Orsi *et al.* showed that some strains from the hospital environment could resist to some antibiotic families, especially aminoglycosides, as well as clinical ones, due to their extensive use in medical practice (not only in anti-pseudomonal therapy) (Orsi, *et al.*, 1994).

Strains isolated from CF individuals presented the highest level of resistance regarding both the multi-resistance and the capacity to resist to all tested antibiotic families (Figures 28C and 29C). The antibiotic selective pressure undergone by strains isolated from the hospital environment may be considered as indirect compared to the antibiotic selective pressure sustained by strains isolated from patients and CF individuals. Moreover, treatments of CF individuals can be considered stronger and longer than treatments of patients. This difference could explain the high antibiotic resistance patterns seen among strains isolated from CF individuals. Earlier studies that compared antibiotic resistance among clinical strains and strains isolated from CF individuals showed that strains from the later were the most sensitive to antibiotics (Chow, *et al.*, 1989). This trend dramatically changed these past 20 years and CF isolates are now considered highly resistant to antibiotic (Lambert, 2002).

In our study most of the *P. aeruginosa* strains from the environment (water, soil related samples and snake breedings), presented the WT resistance phenotype as expected if regarding their low supposed exposition to antibiotics (Figure 28B and 29B). Surprisingly, no resistance was observed in strains isolated from water samples, even in strains from the wastewater treatment plant system (Figure 28B). This result was rather unexpected as different studies revealed the presence of antibiotic resistant strains of *P. aeruginosa* in wastewater (Filali, *et al.*, 2000). Schwartz *et al.* (2006) recently reported the presence of ciprofloxacin resistant strains of *P. aeruginosa* in clinical and municipal wastewater as well as in the effluent of the wastewater treatment plant system. Moreover, presence of detergent could have played the role of selective pressure by a co-resistance phenomenon. However we reported on resistance phenotypes among some strains isolated from snakes and among six strains from soil related samples. We previously reported that resistance to gentamycin and tobramycin in strains from healthy snakes resulted from the presence of an integron composed with *qacH*, *aadB*, *aadA2* and *cmlA10* cassettes and a *tetA(C)*-carrying transposon (Colinon, *et al.*, 2009). These elements permit resistance to quaternary ammonium, aminoglycosides, chloramphenicol and tetracycline, respectively. We then hypothesized that their acquisition resulted from the use of antiseptics for animal care. Strains from soil related samples were resistant to ticarcillin, ticarcillin + clavulanic acid (β -lactam, penam), imipenem (β -lactam, carbapenem) and/or pefloxacin (Figure 29B). Two of these strains were from hydrocarbon impacted sites and were resistant to ticarcillin, ticarcillin + clavulanic acid and imipenem. *P. aeruginosa* is frequently found in hydrocarbon sites and its antibiotic resistance profile has already been investigated. The recent study of Kaszab *et al.* (2009) showed that 33 % of the strains isolated from hydrocarbon impacted sites were resistant to at least two antibiotic

families, suggesting that particular conditions exist that favour the selection of antibiotic resistance mechanisms. Imipenem resistance, rarely described in the environment, has been found in strains from hydrocarbon impacted sites in both our study and the study of Kaszab *et al.* However the precise nature of the environmental pressure i.e., hydrocarbon compounds, heavy metals... is unknown. Since heavy-metal resistance and antibiotic resistance might be genetically linked and share a common origin (Baker-Austin *et al.*, 2006), we looked at the heavy metal resistance phenotype and genotype of *P. aeruginosa* strains as well as at the potential relationships between heavy metal resistance and antibiotic one. Environmental strains were found more resistant to heavy metal than hospital ones (Figure 30A) and the highest resistance was observed among the strains originating from soil related samples whereas the lowest was found among strains from the CF individuals or healthy captive snakes (Figure 30B and C). Environmental strains isolated from water and soil related samples had similar resistance profiles and represented most of the heavy metal resistant strains, regarding zinc, cadmium and low concentration of copper (Figure 30B). Environmental strains were isolated from ecosystems where antibiotic selective pressure may be low but other pressures as presence of pollutants, as heavy metals and organic compounds in hydrocarbon impacted sites or various organic compounds such as detergents and heavy metals in wastewater treatment plant system, could be favourable to the selection or the maintenance of heavy metal resistance. On the opposite, only 30 % of the strains isolated from snakes were able to resist to the lowest concentration of only two metals (copper and cadmium) (Figure 30B). No more than 25 % of strains from CF individuals showed resistance to the 4 tested metals (Figure 30C). These observations suggested that strains isolated from niches with low microbial community diversity and limited exchange, as CF lungs or healthy captive snakes, were less likely to resist to heavy metals due to more restricted and “specialized” environmental conditions. Despite very different antibiotic selective pressure in their original niches, few of these strains were able to resist to heavy metals. This resistance seemed not to be linked to antibiotic selective pressure in these ecosystems and the low level of resistance may be more likely due to the absence of direct pressure as heavy metals and to the adaptation to the niche.

Resistance to cadmium, zinc and copper in *P. aeruginosa* is mediated by active efflux pumps. These pumps are chromosomally encoded by two operons, the *cop* operon for copper resistance (Vargas *et al.*, 1995) and the *czc* operon for zinc, cadmium and cobalt resistance (Hassan *et al.*, 1999; Perron *et al.*, 2004). Amplification of *copA*, *copB* and *czcA* genes was done to evaluate the distribution of the genes and the implication of their prevalence in the

diversity of the resistance phenotypes observed among the strains. Despite different heavy metal resistance phenotypes, the *czcA*, *copA* and *copB* genes were always present. Hassan *et al.* has already observed that different phenotypes of zinc and cadmium resistance can occur despite the presence of the *czc* operon (Hassan, *et al.*, 1999). Absence of resistance, especially in strains isolated from snakes, can not be explained by the absence of implicated genes. However, the variable resistance phenotype observed among the strains could be explained by a regulatory failure or the ineffectiveness of the pump due to discrete mutation. In particular, we observed that variations in the sequence of these genes occurred in the sequenced genomes and could be responsible for the phenotype diversity observed. Differences have also been observed between sequences from the clinical strain PAO1 and the environmental strain CMG103, characterized by a higher capacity of resistance (Perron *et al.*, 2004). Thus, all the strains could potentially resist to these metals due to the presence in the chromosome of resistance genes as the presence in all sequenced strains; however, function and regulation of the pumps could depend on the presence or absence of selective pressure in the ecological niche and may be lost when pressure is absent.

Several studies suggested that presence of zinc or copper could increase resistance to imipenem in *P. aeruginosa* by a co-regulation phenomenon (Caille *et al.*, 2007; Perron *et al.*, 2004). However, in our study, imipenem resistance seemed independent to zinc or copper resistance, since the most highly copper or zinc resistant strains were not resistant to imipenem. Regarding resistance to mercury and high concentration of copper, clinical strains were dominant among the resistant strains (Figure 30A). These results suggested that conditions in the hospital were favourable to the acquisition and/or maintenance of these resistances. To our knowledge, it is the first time that clinical strains highly resistant to copper were observed. This observation is of particular interest as copper could potentially be used as biocide in hospital (Harrison, *et al.*, 2008, Huang, *et al.*, 2008). As mercury had been used in hospital during many years as disinfectant or in thermometer, it could have selected the resistance (Hammond, *et al.*, 1987). However, its use is now prohibited. Other compounds such as antibiotics may act in selecting and/or maintaining mercury resistance, as mercury and antibiotic resistance genetic determinants may be present on the same mobile element as plasmid or genomic island and can be acquired simultaneously (Liebert, *et al.*, 1999, Levings, *et al.*, 2007). Enzymatic mechanism implicated in mercury resistance is encoding by the *merRTPA* operon (Nascimento & Chartone-Souza, 2003). The presence of *merA* determinants, encoding a mercuric reductase which reduces Hg^{2+} to volatile Hg^0 , was investigated. *MerA* was often found among the tested strains, especially in clinical ones

(Table 7). We observed that strains possessing *merA* were not always able to grow in presence of mercury. Several hypotheses could explain the presence of the gene without the resistance phenotype. We can hypothesise that mercury is present at very low but sufficient concentration to maintain *mer* operon. Then, *merA* gene (*mer* operon) could play other functions, which explain its maintenance, as in *Nitrosomonas europea*, in which *merA* is expressed in presence of other metal as cadmium or zinc (Radniecki, *et al.*, 2009, Radniecki, *et al.*, 2009). Finally, mercury resistance genes could be present on mobile element with antibiotic resistance genes and antibiotic pressure selects both resistance traits, especially in hospital strains; the function of mercury resistance may have been lost by mutation or deletion phenomenon.

This study showed variability in resistance capacities of *P. aeruginosa* strains, depending on the origin of the strains. This diversity could be explained by a deep adaption to the original niche, independently of a common genetic background. The lack of relationship between antibiotic resistance and heavy metal resistance (Figure 31) could be explained by the characteristics of the environments from which the strains originated. The rare studies highlighting antibiotic and heavy metal resistance in *P. aeruginosa* are generally conducted on highly contaminated sites. For instance, Oyetibo *et al.* (2009) showed the presence of *P. aeruginosa* like-isolates which were resistant to 18 antibiotics and to high level of metal including cadmium and mercury in sediments but the samples were collected from an industrial area in Nigeria known to be heavily polluted with heavy metals (chromium, lead, cadmium and nickel) (Oyetibo, *et al.*, 2009). Similarly a study conducted on sewage water in Morocco evidenced the presence of *P. aeruginosa* isolates among various species resistant to heavy metals. The *P. aeruginosa* isolates were the most resistant to antibiotics (Filali *et al.*, 2000). However, the fact that none of the environments investigated here, except the soil contaminated with hydrocarbons, showed high levels of toxicants could explain the lack of association between heavy metal and antibiotic resistance in strains of our study.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a CORUS project of the French “Ministère des Affaires étrangères” and a EC2CO project supported by the INSU and INEE departments of CNRS. A. Deredjian was funded by a grant from the CNRS. We thank participants of the CORUS and

EC2CO projects for soil sampling. We thank the PARMIC technical platform and Rhône-Alpes Region Cluster “Environnement”.

REFERENCES

- Alonso A, Rojo F & Martinez JL (1999).** Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* 1: 421-430.
- Alonso A, Campanario E & Martinez JL (1999).** Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145 (Pt 10): 2857-2862.
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R & McArthur JV (2006).** Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14: 176-182.
- Berg J, Tom-Petersen A & Nybroe O (2005).** Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett Appl Microbiol* 40: 146-151.
- Bischoff KM, White DG, Hume ME, Poole TL & Nisbet DJ (2005).** The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 243: 285-291.
- Bouskill NJ, Barnhart EP, Galloway TS, Handy RD & Ford TE (2007).** Quantification of changing *Pseudomonas aeruginosa* *sodA*, *htpX* and *mt* gene abundance in response to trace metal toxicity: a potential in situ biomarker of environmental health. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 276-286.
- Caille O, Rossier C & Perron K (2007).** A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 4561-4568.
- Cardoso O, Alves AF & Leitao R (2008).** Metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *Int J Antimicrob Agents* 31: 375-379.
- Chow AW, Wong J, Bartlett KH, Shafran SD & Stiver HG (1989).** Cross-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin, extended-spectrum beta-lactams, and aminoglycosides and susceptibility to antibiotic combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1368-1372.
- Colinon C, Miriagou V, Carattoli A, Luzzaro F & Rossolini GM (2007).** Characterization of the IncA/C plasmid pCC416 encoding VIM-4 and CMY-4 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 60: 258-262.

- Colinon C, Jocktane D, Brothier E, Rossolini GM, Cournoyer B & Nazaret S (2009).** Genetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from healthy captive snakes: evidence of high inter- and intrasite dissemination and occurrence of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol*.
- Conejo MC, Garcia I, Martinez-Martinez L, Picabea L & Pascual A (2003).** Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2313-2315.
- Dart JK (1988).** Predisposing factors in microbial keratitis: the significance of contact lens wear. *Br J Ophthalmol* 72: 926-930.
- De Meyer G & Hofte M (1997).** Salicylic Acid Produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 Induces Resistance to Leaf Infection by *Botrytis cinerea* on Bean. *Phytopathology* 87: 588-593.
- De Vicente A, Aviles M, Codina JC, Borrego JJ & Romero P (1990).** Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *J Appl Bacteriol* 68: 625-632.
- Dean CR, Visalli MA, Projan SJ, Sum PE & Bradford PA (2003).** Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 972-978.
- Deziel E, Paquette G, Villemur R, Lepine F & Bisailon J (1996).** Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 62: 1908-1912.
- Fajardo A, Martinez-Martin N, Mercadillo M, et al. (2008).** The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One* 3: e1619.
- Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M & Blaghen M (2000).** Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr Microbiol* 41: 151-156.
- Foweraker J (2009).** Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull* 89: 93-110.
- Gould IM (2008).** The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 1: S2-9.
- Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SK & Vitanza-jack VB (1974).** Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 28: 987-991.
- Hammond SA, Morgan JR & Russell AD (1987).** Comparative susceptibility of hospital isolates of gram-negative bacteria to antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect* 9: 255-264.

- Harrison JJ, Turner RJ, Joo DA, et al. (2008)** Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2870-2881.
- Hassan MT, van der Lelie D, Springael D, Romling U, Ahmed N & Mergeay M (1999).** Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 238: 417-425.
- Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W & Wiedemann B (2007).** Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 4062-4070.
- Heuer H, Szczepanowski R, Schneiker S, Puhler A, Top EM & Schluter A (2004).** The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1beta group without any accessory genes. *Microbiology* 150: 3591-3599.
- Huang HI, Shih HY, Lee CM, Yang TC, Lay JJ & Lin YE (2008).** In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: implications for on-site disinfection for hospital infection control. *Water Res* 42: 73-80.
- Hunter PR (1993).** The microbiology of bottled natural mineral waters. *J Appl Bacteriol* 74: 345-352.
- Kaszab E, Kriszt B, Atzel B, Szabo G, Szabo I, Harkai P & Szoboszlay S (2009).** The Occurrence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* on Hydrocarbon-Contaminated Sites. *Microb Ecol*.
- Kerr KG & Snelling AM (2009).** *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 73: 338-344.
- Khan NH, Ishii Y, Kimata-Kino N, Esaki H, Nishino T, Nishimura M & Kogure K (2007).** Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb Ecol* 53: 173-186.
- Kohler T, Kok M, Michea-Hamzehpour M, et al. (1996).** Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2288-2290.
- Lambert PA (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 95 Suppl 41: 22-26.
- Lambert RJ, Joynson J & Forbes B (2001).** The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. *J Appl Microbiol* 91: 972-984.

- Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, et al. (2008).** Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *J Appl Microbiol* 105: 1491-1501.
- Ledbetter EC, Kim SG & Dubovi EJ (2009).** Outbreak of ocular disease associated with naturally-acquired canine herpesvirus-1 infection in a closed domestic dog colony. *Vet Ophthalmol* 12: 242-247.
- Levings RS, Partridge SR, Djordjevic SP & Hall RM (2007).** SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 317-323.
- Liebert CA, Hall RM & Summers AO (1999).** Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 507-522.
- Martinez JL (2009).** Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157: 2893-2902.
- Matyar F, Kaya A & Dincer S (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci Total Environ* 407: 279-285.
- McManus AT, Mason AD, Jr., McManus WF & Pruitt BA, Jr. (1985).** Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a burn center. *Eur J Clin Microbiol* 4: 219-223.
- Morita Y, Kimura N, Mima T, Mizushima T & Tsuchiya T (2001).** Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Gen Appl Microbiol* 47: 27-32.
- Nascimento AM & Chartone-Souza E (2003).** Operon *mer*: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res* 2: 92-101.
- Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F & Blazquez J (2000).** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1254.
- Orsi GB, Mansi A, Tomao P, Chiarini F & Visca P (1994).** Lack of association between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital wards. *J Hosp Infect* 27: 49-60.
- Osborne AD, Armstrong K, Catrysse NH, Butler G & Versavel L (1981).** An outbreak of *Pseudomonas* mastitis in dairy cows. *Can Vet J* 22: 215-216.

- Oyetibo GO, Ilori MO, Adebuseye SA, Obayori OS & Amund OO (2009).** Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and antibiotics in Nigerian contaminated systems. *Environ Monit Assess* 168: 305-314.
- Pellett S, Bigley DV & Grimes DJ (1983).** Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 45: 328-332.
- Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL & Kohler T (2004).** CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279: 8761-8768.
- Radniecki TS, Semprini L & Dolan ME (2009).** Expression of *merA*, *amoA* and *hao* in continuously cultured *Nitrosomonas europaea* cells exposed to zinc chloride additions. *Biotechnol Bioeng* 102: 546-553.
- Radniecki TS, Semprini L & Dolan ME (2009).** Expression of *merA*, *trxA*, *amoA*, and *hao* in continuously cultured *Nitrosomonas europaea* cells exposed to cadmium sulfate additions. *Biotechnol Bioeng* 104: 1004-1011.
- Reid TM & Porter IA (1981).** An outbreak of otitis externa in competitive swimmers due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hyg (Lond)* 86: 357-362.
- Richard P, Le Floch R, Chamoux C, Pannier M, Espaze E & Richet H (1994).** *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. *J Infect Dis* 170: 377-383.
- Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N & Vinas M (2004).** Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Arch Med Res* 35: 251-257.
- Schwartz T, Volkmann H, Kirchen S, Kohnen W, Schon-Holz K, Jansen B & Obst U (2006).** Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 158-167.
- Strateva T & Yordanov D (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 58: 1133-1148.
- Syrmis M, Bell S, Bye P, et al. (2008).** High prevalence of a class 1 integron-associated *aadB* gene cassette in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an Australian cystic fibrosis patient population. *Pathology* 40: 524-525.
- Thioulouse J & Lobry JR (1995).** Co-inertia analysis of amino-acid physico-chemical properties and protein composition with the ADE package. *Comput Appl Biosci* 11: 321-329.

Vargas E, Gutiérrez S, Ambriz ME, Cervantes C. (1995). Chromosome-encoded inducible copper resistance in *Pseudomonas* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 68:225-229.

“High phenotypic and genetic diversity of antibiotic and metal susceptibilities among hospital and environmental strains of *Stenotrophomonas maltophilia*”

Amélie Deredjian^{*}, Laurine Blanchard, Elisabeth Brothier, Sylvie Nazaret and Sabine Favre-Bonté.

Université de Lyon, France; Research Group on « Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment », CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, and Université Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne, France.

Short running title: Antibiotic and metal susceptibilities in *Stenotrophomonas maltophilia*

Key-words: antibiotic resistance, metal, hospital, soil, genes, *Stenotrophomonas maltophilia*

^{*}Corresponding author. Mailing address: Université de Lyon, France; Research Group on « Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment », CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, and Université Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne, France.

ABSTRACT

Stenotrophomonas maltophilia has recently emerged as an important opportunistic pathogen responsible of nosocomial infection and able to colonize lungs of CF individuals. This species is also a ubiquitous microorganism widespread in the environment, especially in soil. We previously recovered *S. maltophilia* in a variety of soils from different geographical origin and impacted by different anthropogenic activities. The aim of the present study was to evaluate antibiotic and heavy metal resistance susceptibilities of the strains previously isolated and to compare them to the ones of hospital strains. We observed that hospital strains presented high resistance capacities concerning both antibiotics and heavy metals (copper, cadmium, zinc and mercury). Environmental isolates presented a high diversity of resistance properties, some of them presenting low levels of resistance, the others presenting resistance capacities similar to the ones of hospital isolates. This diversity depended on their origin and suggested a high adaptation to the environmental conditions encountered in the original niche. A high variability was also observed in the prevalence of antibiotic resistance genes (*blaL2*, *smeV*, *qnrB*, *smlt3652*) and heavy metal resistance genes (*copA*, *czcA*, *czcC* and *merA*) in both environmental and hospital isolates suggesting that *S. maltophilia* strains were also characterized by a high genotypic diversity.

INTRODUCTION

Stenotrophomonas maltophilia previously known as *Pseudomonas maltophilia* then *Xanthomonas maltophilia* is considered as an emerging opportunistic pathogen, representing the third non fermenting gram negative bacteria implicated in nosocomial infections (Jones, *et al.*, 2003) and increasingly isolated from cystic fibrosis patients (Razvi, *et al.*, 2009). Its capacity to colonize and durably survive in hospital and patients is partly due to its high antibiotic resistance capacities. Intrinsic resistance of *S. maltophilia* is due to the presence of broadly specific efflux pumps such as SmeABC and SmeDEF, the L1 and L2 metallo- β -lactamases, the AAC(6')-Iz and APH(3')-IIa aminoglycoside modifying enzymes and the Qnr peptide allowing resistance to quinolones (Sanchez, *et al.*, 2009). Different studies highlighted the capacities of clinical strains to develop antibiotic resistance mechanisms by mutation or acquisition of mobile elements (Avison, *et al.*, 2000, Chang, *et al.*, 2004, Toleman, *et al.*, 2007). Resistance to trimethoprim + sulfamethoxazole (SXT), the therapy of choice for treating *S. maltophilia* infections, is mediated by *sul* genes acquired by horizontal transfer (Toleman, *et al.*, 2007). Inappropriate and extensive use of antibiotics in the hospital has largely participated to the emergence and propagation of multi-resistance in pathogenic bacteria (Slama, 2008). However, it is now admitted that high concentration of antibiotics could not completely explain this phenomenon as a reduction of antibiotic use has only a limited effect on the reduction of antibiotic multi-resistance (Cook, *et al.*, 2004). Other chemicals used in the hospital as antiseptics or disinfectants can also play the role of selective pressure leading to acquisition of antibiotic resistance mechanisms. For instance, Sanchez *et al.* (2005) showed that triclosan, an antibacterial and antifungal molecule (targeting fatty acid synthesis) used in cleaning solution or in the coatings of hospital devices, selected *S. maltophilia* mutants that overproduced the SmeDEF efflux pump leading to the reduction of their antibiotic susceptibility.

S. maltophilia is also known for a long time as a ubiquitous microorganism found in a variety of natural environments like soil (Juhnke & des Jardin, 1989), water (Romano, *et al.*, 1997) or sediments (Dungan, *et al.*, 2003). Soil (Deredjian *et al.*, submitted) and rhizosphere (Berg *et al.*, 1996) are considered as reservoirs of *S. maltophilia* which is largely studied for its plant promoting growth capacities and its potential use as a biological control of plant pathogens (Ryan, *et al.*, 2009). This bacterium is also frequently found in extreme ecosystems as deep sea or high altitudes (Romanenko, *et al.*, 2008, Flores, *et al.*, 2009) or polluted sites (Matyar, *et al.*, 2008), revealing high capacities of adaptation as well as particular properties potentially

used in biotechnologies especially for bioremediation of polluted sites (Juhasz, *et al.*, 2000, Dungan, *et al.*, 2003). However, antibiotic resistance capacity of environmental isolates of *S. maltophilia* is poorly investigated as well as factors implicated in the selection of this resistance. For instance, only one study aimed at comparing antibiotic resistance capacity of environmental and clinical strains of *S. maltophilia*. This study suggested that antibiotic resistance capacity was not dependant of the origin of the strains (Berg, *et al.*, 1999). Moreover, the sequencing of the genomes of the poplar associated strain R551-3 (Taghavi, *et al.*, 2009) and of the clinical strain K279a (Crossman, *et al.*, 2008) of *S. maltophilia* revealed the presence of a large number of multidrug resistance determinants, despite their different origins, suggesting that antimicrobial resistance could also be acquired out of the hospital (Ryan, *et al.*, 2009). Comparison analysis of the two genomes has shown a high synteny and a core genome composed of 85 % of common genes between the two strains, enabling adaptation to a wide range of habitats (Rocco, *et al.*, 2009).

Environment, especially soil, is considered as a reservoir of antibiotic resistance determinants (D'Costa, *et al.*, 2006) and environmental conditions susceptible to play the role of selective pressure for the acquisition of these determinants are now investigated (Alonso, *et al.*, 2001). Presence of antibiotics due to antibiotic producing microorganisms or anthropogenic activities (farming, Human and animal consumption) can act as pressure leading to the selection of antibiotic resistance in the indigenous bacterial populations (Martinez, 2009). Other conditions that modify the equilibrium of the community could participate to the selection of resistance mechanisms. Among these conditions, presence of heavy metals or organic compounds has already been reported to lead to the selection of antibiotic resistance linked to heavy metal resistance in the bacterial community (Filali, *et al.*, 2000, Berg, *et al.*, 2005, Stepanauskas, *et al.*, 2005, Wright, *et al.*, 2006, Matyar, *et al.*, 2008).

We previously isolated strains of *S. maltophilia* from soil sampled in different sites submitted to different agricultural practices leading to different levels and nature of contaminations that could influence resistance capacities of the indigenous communities (Deredjian *et al.*, submitted). Here we aimed at evaluating the antibiotic resistance capacity of these strains and highlighting anthropogenic activities that could favour antibiotic resistance selection and maintenance in environmental strains of *S. maltophilia*. Antibiotic resistance capacities were determined in a collection of 52 environmental strains isolated from soils sampled in agricultural sites submitted to different anthropogenic pressures and compared to the ones of 27 clinical strains from CF individuals and infected patients. As antibiotic resistance could be linked to heavy metal resistance, heavy metal resistance capacities were also determined. The

presence of resistance genes were investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR).targeting heavy metal resistance genes (*copA*, *czcA*, *czcC* and *merA*) and antibiotic resistance genes (*blaL2*, *smeV*, *qnrB*, *smlt3652*).

MATERIAL AND METHODS

Strains

A collection of 79 strains of *S. maltophilia* was used in this study (Table 8). These strains were chosen taking into account their origin and the putative anthropogenic selective pressure present in their original niche. Environmental strains (52 strains) were isolated from soil samples from 4 agricultural sites chosen depending on the nature and level of the supposed selective pressure (Table 9). Detailed information of these sites can be found in Deredjian *et al.* (submitted). Clinical strains (27 strains) provided by “l’Observatoire National de Toulouse”, were used for comparison. These strains were isolated from CF individuals (12 strains) and from infected patients (15 strains). The two sequenced strains K279a and R551-3 were included in this study as reference. The identity of the isolates was confirmed using first, the *smeD/ggpS* PCR duplex PCR (Ribbeck-Busch, *et al.*, 2005). Then, the complete 16S rRNA gene was amplified and sequenced. Clones were differentiated using a REP-PCR method (Lin, *et al.*, 2008), in order to keep only different isolates in our study.

Antibiotic resistance test

The *in vitro* antimicrobial susceptibilities of *S. maltophilia* were routinely determined using the VITEK 2 system with a card (NO93) permitting to establish antibiotic resistance profile of non fermenting Gram negative bacteria (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) following recommendations of the manufacturer. Briefly, a suspension was prepared from a 24h pure culture realised on TSA (Tryptic Soy Agar) in a saline solution (NaCl₂ 0.4 %) in order to reach an optical density between 0.50 and 0.63 McFarland. Then, 145 µL of this suspension was added to a new 3 ml saline solution (NaCl₂ 0.4 %). This suspension was adsorbed by capillarity on the card. Minimal inhibitory concentrations were then determined by measuring growth at different points during the incubation and comparing it in control and antibiotic supplemented wells.

Table 8. Strains of *S. maltophilia* isolated from the hospital and the environment.

Origin	Strains Name	Putative anthropogenic pressure
Environment		
Feucherolles (Versailles, France)	V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13	organic amendments -
Nabeul (Tunisia)	N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N13, N14, N15, N16, N17	wastewater irrigation +
Ouagadougou (Burkina Faso)	O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8	urban rough waste amendments ++
Pierrelaye (France)	P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14	wastewater (from Paris) irrigation during a century +++++
Hospital		
CF individuals	CF1, CF2, CF3, CF4, CF5, CF6, CF7, CF8, CF9, CF10, CF11, CF12	antibiotic treatments, antiseptics used for disinfection +++++
Infected patients	I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8, I9, I10, I11, I12, I13, I14, I15	antibiotic treatments, antiseptics used for disinfection +++++
Sequenced strains		
	K279a, R551-3	

Table 9. Soil characteristics.

	Depth cm	Clay g kg ⁻¹	Silt g kg ⁻¹	Sand g kg ⁻¹	pH water	organic carbon %	Cd mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹	Cu mg kg ⁻¹	Pb mg kg ⁻¹
France										
Feucherolles	0-10	190	750	60	6.9	1.1	0.23	49	12	25
Pierrelaye										
Control	0-10	11.8	12.3	75.9	8.33	1.98	0.34	57	16	37
Control	0-10	7.5	10.9	81.6	8.23	1.39	0.25	65	17	34
Control	0-10	9.8	14.8	75.4	8.09	2.29	0.94	178	47	95
4	0-10	10.7	16.9	72.5	7.23	2.78	1.7	464	123	188
5	0-10	6.2	14.2	79.6	7.43	3.51	3.9	979	281	447
6	0-10	9.1	17.9	73	7.41	5.22	7.2	1326	357	521
7	0-10	5.8	11.1	83.2	7.39	2.93	2.4	1336	352	506
8	0-10	6.3	12.3	81.2	7.4	3.01	3.0	491	138	202
9	0-10	7	11.4	81.6	7.65	1.97	1.8	715	189	283
10	0-10	6.1	10.6	83.3	7.42	2.12	1.7	465	123	224
11	0-10	6.9	12.3	80.8	7.33	2.59	34	814	188	295
12	0-10	9.6	17	73.4	7.47	2.76	5.9	697	180	274
13	0-10	8.9	12	79.2	7.73	1.71	2.2	327	94	129
14	0-10	7.2	10.1	82.7	7.49	1.45	1.3	240	76	130
15	0-10	5.6	6.3	88.1	7.19	1.73	2.1	401	108	158
19	0-10	12.2	13.1	74.7	7.86	3.18	1.2	220	57	141
21	0-10	11.1	10.8	78.1	7.73	2.54	1.3	271	112	117
Tunisia										
Nabeul WW	0-20	93	96	811	8.42	2.4	0.54	68	30	41
Nabeul GW	0-20	110	82	808	8.23	1.1	0.7	64	29	25
Burkina Faso										
Tabtenga control	0-10	nd	nd	nd	5.63	0.3	bdl	17	4	nd
Tabtenga amended					6.09		bdl	241	5	nd
Zagtouli control	0-10	nd	nd	nd	6.17	0.3	bdl	8	2	nd
Zagtouli amended					7.24		bdl	78	6	nd
Toudoubweogo control	0-10	nd	nd	nd	5.63	0.3	bdl	32	12	nd
Toudoubweogo amended					7.54		bdl	252	6	nd
Yagma control	0-10	110	200	690	5.59	0.3	bdl	15	8	nd
Yagma amended					7.36		bdl	241	16	nd

nd : not done

bld : below detection limit

Minimal inhibitory concentrations of 16 antibiotics [ticarcillin (TIC 16, 32, 64 µg/ml), ticarcillin-clavulanic acid (TIM 8/2, 32/2, 64/2 µg/ml), piperacillin (PIP 4, 16, 64 µg/ml), piperacillin-tazobactam (TZP 4/4, 16/4, 128/4 µg/ml), ceftazidim (CAZ 1, 2, 8, 32 µg/ml), cefepim (FEP 2, 8, 16, 32 µg/ml), imipenem (IPM 2, 4, 16 µg/ml), meropenem (MEM 0.5, 4, 16 µg/ml), amikacin (AMK 8, 16, 64 µg/ml), gentamicin (GEN 4, 16, 32 µg/ml), isepamicin (ISP 4, 8, 32 µg/ml), tobramycin (TOB 8, 16, 64 µg/ml), ciprofloxacin (CIP 0.5, 2, 4 µg/ml), pefloxacin (PEF 0.5, 2, 8 µg/ml), colistin (CS 4, 16, 32 µg/ml), trimethoprim-sulfamethoxazol (SXT 0.5/9.5, 2/38, 16/304 µg/ml)] were determined. Interpretations were established following the recommendations of the antibiogram committee of the French society of Microbiology.

Heavy metal resistance profiles

Heavy metal resistance of *S. maltophilia* strains were established using TSA medium diluted 10 fold (TSA 1/10) supplemented with 5, 10, 20, 50 mM of Zn²⁺ (ZnCl₂), 0.5, 1, 2, 5 mM of Cu²⁺ (CuCl₂), 0.6, 1.25, and 2.5 mM of Cd²⁺ (CdCl₂), 10 and 50 µM of Hg²⁺ (HgCl₂). Preliminary tests were done in order to define the suitable concentrations. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain and the 979 clinical strain were used as control for each manipulation. A suspension was realised from a 24h pure culture on TSA 1/10 in a saline suspension (NaCl 0.8 %). One hundred µL of the suspension was inoculated on the supplemented and non supplemented TSA1/10 plates. Cultures were incubated at 28°C during seven days. A strain was considered as resistant when growth on medium supplemented with metal was equivalent of growth on medium without metal. When growth was lower, the resistance was intermediate. When no growth was obtained, the strain was considered as sensitive. Experiments were repeated twice.

Data analysis

A principal component analysis was done using all the phenotypic results obtained with the ADE-4 software (Thioulouse & Lobry, 1995). The phenotypic data from antibiotic and heavy metal resistance testing were encoded either as 0 (sensitivity), 1 (intermediate) or 2 (resistance).

Resistance genes amplification

The primers used in this study are summarized in Table 10. Primers were designed by searching conserved sequences after alignments of the sequences of the genes from the 2

sequenced genomes, using the Oligo6 software, except for the design of *merA*. Primers specific of *merA* gene, encoding the mercuric reductase, were previously defined after sequence alignment of *merA* genes of Gram negative bacteria available in GenBank (Ranjard *et al.*, pH thesis). Primers specific to the *czcC* gene were only designed from the K279a *czcC* gene due to the absence of this gene in R551-3. Presence of the *qnrB*, *blaL2*, *smlt3652*, *smeV*, *copB*, *czcA*, *czcC*, *merA* was investigated by PCR in all the collection strains. The following PCR cycle was used to amplify *qnrB*, *blaL2*, *smlt3652*, *smeV*, *copB*, *czcA*, *czcC* genes: an initial denaturation step is done at 94°C during 5 min. This first step is followed by 35 cycles of 30 sec denaturation at 94°C, 30 sec of primer annealing at variable temperature (see Table 10), 30 sec of primer extension at 72°C. Finally, a final extension was done during 7 min at 72°C. Each amplification product was sequenced in order to verify their affiliation to the expected gene.

Table 10. Primers used in the study.

ORF	Function	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Product size bp	Annealing temperature °C
<i>qnrB</i>	quinolone resistance peptide	GCCTGGAGATCAGCGAGTG	CAGGTCGCAGTCGGTGAAG	281	52
<i>blaL2</i>	β-lactamase	GTGCCGTGCCACGATCA	CCATTGCTGCCGGTCTTGT	351	54
<i>smlt3652</i>	putative β-lactamase	AGCCTGCGTCGTCGATCC	GCACGCGCTCGCCATAGGT	134	58
<i>smeV</i>	putative multidrug efflux protein	CGGTGCAGAGCGTTGA	GTACTCGGCCTGGTAGCTG	265	54
<i>copB</i>	putative Cu resistance protein	CCACCGAACC GCGGAACC	CCGACCAGCACGTCCACCA	388	62
<i>czcA</i>	putative Cd, Zn, Co efflux protein	CAGGTCACCGCATCTTCAC	GATGCACGCCGTATTCCTTG	310	60
<i>czcC</i>	putative Cd, Zn, Co efflux protein	GCGGCGGCTTCGACTTCC	GCACCCATCCCAGCGTCCAG	1072	65
<i>merA</i>	mercuric reductase	GTGCCGTCCAAGATCATGAT	TAGCCYACRGTSGCSACYTG	933	57

RESULTS

Antibiotic resistance profile

The antimicrobial susceptibility of the 79 *S. maltophilia* strains was tested. A high diversity of antibiotic resistance profiles was observed considering both the number of antibiotics, i.e. multi-resistance (Figure 32) and the type of antibiotics (Figure 33) independently of the origin of the strains (i.e. hospital versus environmental). Resistance to 1 to 15 antibiotics was obtained in both hospital and environmental strains (Figure 32A). Only 7 % of hospital strains did not resist to more than 3 antibiotics. Thirty % were resistant to 4 to 6 antibiotics, 15 % to 7 to 9 antibiotics, 26 % to 10 to 12 antibiotics and 22 % to more than 13 antibiotics (Figure 32A). Strains isolated from infected patients were dominant among hospital strains resistant to 4 to 6 antibiotics and to 10 to 12 antibiotics (Figure 32B).

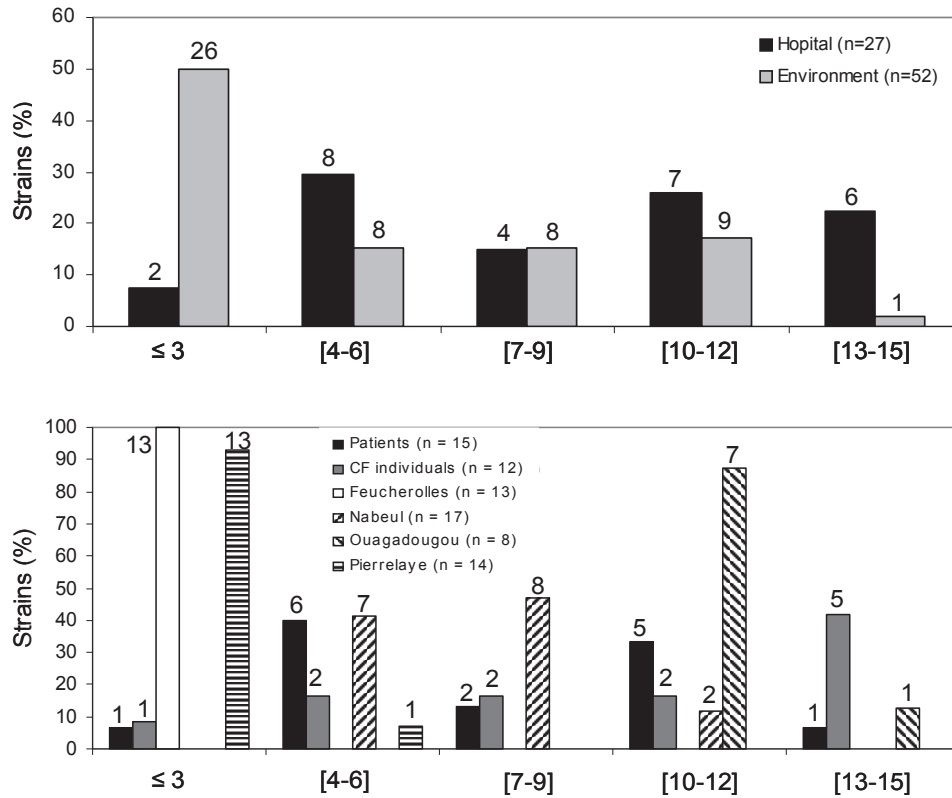


Figure 32. Antibiotic multi-resistance in 52 environmental and 27 hospital strains of *S. maltophilia* (A), within environmental and hospital strain sub-groups (B). Effectives are indicated above bars; n = number of strains in each category; [] = number of antibiotics.

Strains isolated from CF individuals were dominant among hospital strains resistant to 13 to 15 antibiotics. Half of the environmental strains did not present resistance to more than 3 antibiotics (Figure 32A). All these strains were isolated from the French sites of Feucherolles and Pierrelaye (100 % and 93 %, respectively) (Figure 32B). The last 7 % of strains (1 strain) isolated from the site of Pierrelaye did not resist to more than 6 antibiotics. Fifteen % of environmental strains were able to resist to 4 to 6 antibiotics, these strains were represented by strains from Pierrelaye (7 %) and strains from Nabeul (Tunisia) (41 %) (Figure 32A and B). All the strains that resisted to 7 to 9 antibiotics (15 % of environmental strains) were isolated from the site of Nabeul (47 %). Environmental strains able to resist to 10 to 12 antibiotics (17 %) were isolated from Nabeul (12 %) and Ouagadougou (Burkina Faso) (88 %). All the environmental strains able to resist to more than 13 antibiotics (2 %) were isolated from Ouagadougou (12 %). Resistance to all tested antibiotics was observed in hospital and environmental strains, except for the association trimethoprim + sulfamethoxazole that was active against all environmental strains (Figure 33A).

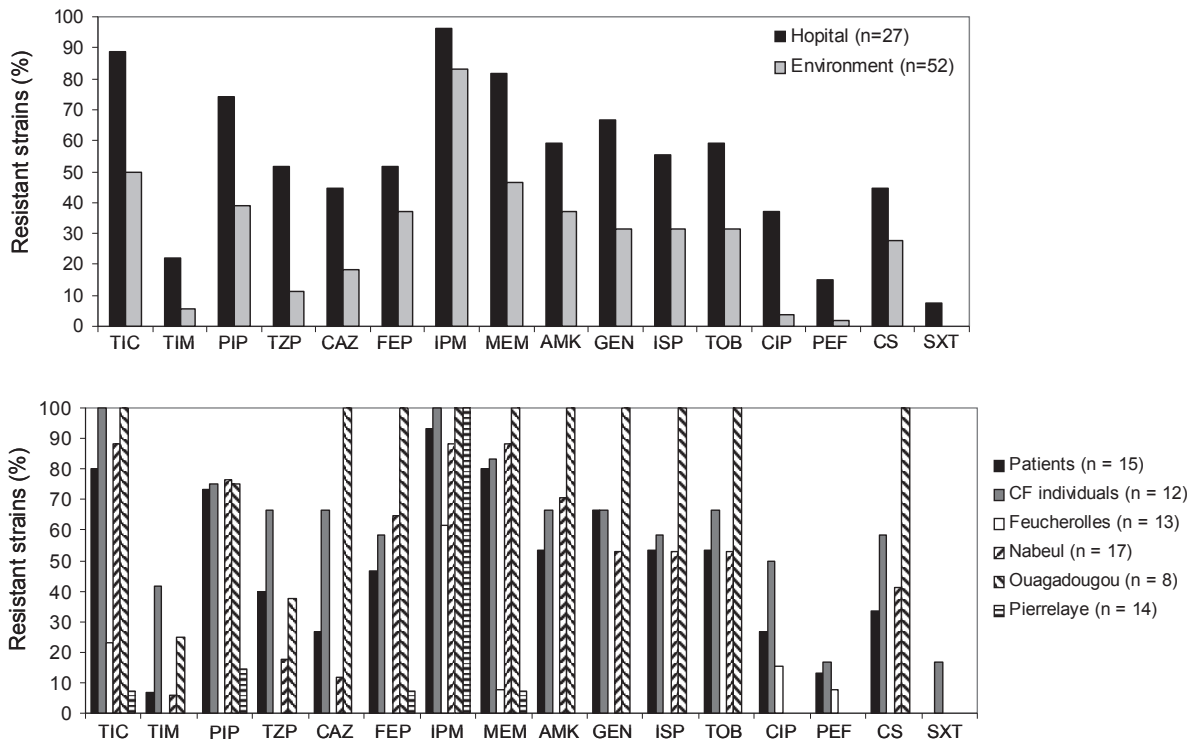


Figure 33. Antibiotic resistance profiles in 52 environmental and 27 hospital strains of *S. maltophilia* (A), within environmental and hospital strain sub-groups (B). n = number of strains in each category; TIC = Ticarcillin, TIM = ticarcillin-clavulanic acid, PIP = piperacillin, TZP = piperacillin-tazobactam, CAZ = ceftazidim, FEP = cefepim, IPM = imipenem, MEM = mereopenem, AMK = amikacin, GEN = gentamicin, ISP = isepamicin, TOB = tobramycin, CIP = ciprofloxacin, PEF = pefloxacin, CS = colistin, SXT = trimethoprim / sulfamethoxazole.

Resistance to all tested antibiotics were observed among strains isolated from CF individuals and infected patients, except trimethoprim + sulfamethoxazole for which resistance was only observed in strains isolated from CF individuals (Figure 33B). Strains isolated from Feucherolles and Pierrelaye presented resistance to the β -lactams ticarcillin (23 % and 7 % of strains isolated from Feucherolles and Pierrelaye respectively), imipenem (62 % and 100 % of strains isolated from Feucherolles and Pierrelaye respectively) and meropenem (8 % and 7 % of strains isolated from Feucherolles and Pierrelaye respectively) (Figure 33B). Resistance to the quinolones ciprofloxacin and pefloxacin was also observed in strains from Feucherolles (15 % and 8 % respectively) and resistance to the β -lactams piperacillin and cefepim was also observed in strains from Pierrelaye (14 % and 7 %, respectively). Concerning strains isolated from Nabeul and Ouagadougou, resistance was observed for all tested antibiotics except

trimethoprim + sulfamethoxazole and the quinolones (ciprofloxacin and pefloxacin) (Figure 33B). Prevalence of resistance was higher in strains from Ouagadougou than in strains from Nabeul. Concerning strains from the site of Nabeul, more than 70 % were resistant to ticarcillin, piperacillin, imipenem, meropenem, amikacin, between 50 % and 70 % of the strains were resistant to cefepim, gentamicin, isepamicin, tobramycin, less than 50 % were resistant to ticarcillin + clavulanic acid, piperacillin + tazobactam, ceftazidim, colistin. All the strains from the site of Ouagadougou were resistant to ticarcillin, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, isepamicin, tobramycin and colistin, 75 % were resistant to piperacillin, 37 % were resistant to piperacillin + tazobactam and 25 % were resistant to ticarcillin + clavulanic acid.

Heavy metal resistance

Both environmental and hospital strains were able to resist to the 4 tested heavy metals, Zn, Cu, Cd and Hg (Figure 34A). We found environmental strains able to grow at the maximal concentration of 5 mM of Zn, 1 mM of Cu, 0.6 mM of Cd and 10 μ M of Hg. Hospital strains were able to grow at the same concentrations of Cu, Cd and Hg but some of them were also able to grow in presence of 10 mM of Zn. None of the strains irrespective of their origin were able to grow in the presence of the highest concentrations tested i.e. 20 and 50 mM of Zn, 2 and 5 mM of Cu, 1.25 and 2.5 mM of Cd and 50 μ M of Hg. We observed that frequency of resistance was higher in the hospital strain group than in the global environmental strain group with 96 % and 33 % of strains resistant to 5 mM of Zn, respectively, 93 % and 52 %, 19 % and 2 % of strains resistant to 0.5 mM and 1 mM of Cu respectively and 44 % and 13 % of strains resistant to 0.6 mM of Cd, respectively. The exception was for Hg, for which resistance was equivalent in environmental strains and in hospital strains (6 % and 4 %, respectively).

Differences within hospital and environmental groups were observed (Figure 34B). Concerning hospital strains, we observed that strains isolated from CF individuals and infected patients presented similar resistance capacity to Zn with 92 % and 100% of strains resistant to 5 mM of Zn, 25 % and 33 % to 10 mM of Zn, respectively and low concentration of Cu with 92 % and 93 % of strains resistant to 0.5 mM of Cu, respectively. Strains isolated from CF individuals were more frequently resistant to 1 mM of Cu and to Cd than strains isolated from infected patients (33 % and 7 %, 58 % and 33 %, respectively). Finally, only one hospital strain was able to grow in presence of 10 μ M of Hg. This strain was isolated from CF individual lungs.

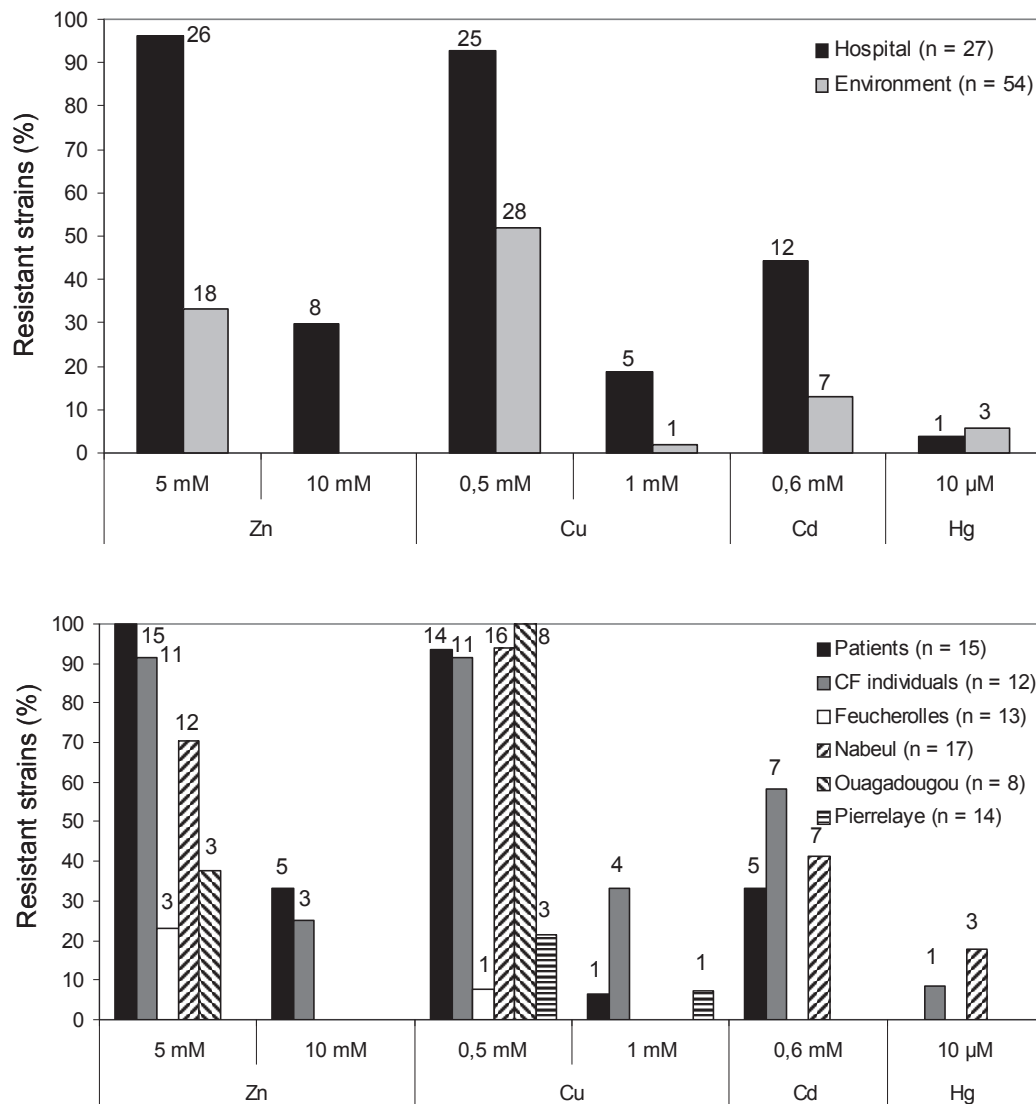


Figure 34. Heavy metal resistance in 52 environmental and 27 hospital strains of *S. maltophilia* (A), within environmental and hospital strain sub-groups (B). Effectives are indicated above bars; n = number of strains in each category.

Concerning environmental strains, heavy metal resistance profiles were very different depending of the origin of the strains. Strains isolated from Pierrelaye (France) were the least resistant since no resistance was observed for Zn, Cd and Hg and only 21 % and 7 % of the strains were able to resist to 0.5 mM and 1 mM of Cu, respectively. Twenty three % and 8 % of strains isolated from Feucherolles (France) and 37 % and 100 % of the strains from Ouagadougou (Burkina Faso) were able to resist to Zn and Cd, respectively. Finally, strains isolated from the site of Nabeul (Tunisia) were able to resist to the 4 tested heavy metals, presenting 71 %, 94 %, 41 % and 18 % of strains able to resist to Zn, Cu, Cd and Hg, respectively, and showing in some case similar level of resistance to hospital strains.

Strains similarity based on antibiotic and heavy metal resistance

The principal component analysis enabled to differentiate 3 groups. The first group was composed of strains isolated from the French sites of Feucherolles and Pierrelaye, the second group was composed of hospital strains and strains from Nabeul (Tunisia) and the third group was composed of hospital strains and strains from Nabeul and Ouagadougou (Burkina Faso) (Figure 35A). These 3 groups were mainly discriminated from each other on the first axis which explained 48 % of the variability. The strains were grouped depending on their resistance capacities toward heavy metals and/or antibiotics (Figure 35B). The first group (strains from Feucherolles and Pierrelaye) were characterized by low antibiotic and heavy metal resistance capacity. The second group (hospital strains and strains from Nabeul) was characterized by high antibiotic and heavy metal resistance. The third group (hospital strains and strains from Nabeul and Ouagadougou) was characterized by high antibiotic multi-resistance capacity, especially resistance to aminoglycosides and polypeptides.

Prevalence of resistance genes

Presence of antibiotic and heavy metal resistance genes was investigated by PCR with specific primers in both hospital and environmental strains. Concerning antibiotic resistance genes, a positive amplification with primers specific to the *smeV* gene, participating to the formation of a putative multidrug efflux pump, was obtained for all hospital strains (from CF individuals and infected patients), for most of the strains isolated from Nabeul (Tunisia), Ouagadougou (Burkina Faso) and Pierrelaye (France) (88 %, 87 % and 86 %, respectively) and none of the strains isolated from Feucherolles (France) (Figure 36A).

A

B

Figure 35. Principal component analysis done with antibiotic and heavy metal resistance phenotype. Repartition of the strains (A), repartition of the variables (heavy metals and antibiotics). ● = strains from CF individuals, ○ = strains from Infected patients, ■ = strains from Ouagadougou, □ = strains from Tunisia, ▲ = strains from Pierrelaye, △ = strains from Feucherolles.

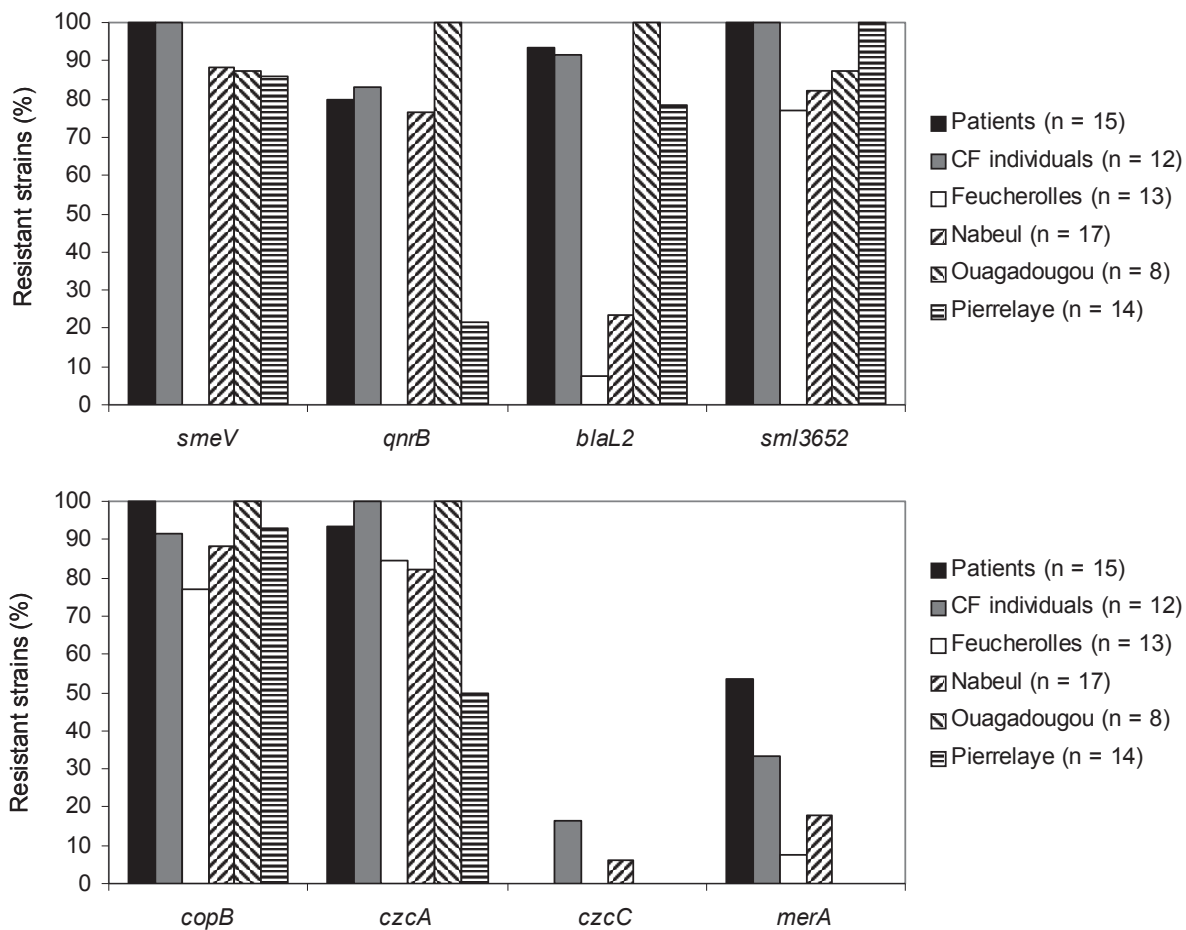


Figure 36. Prevalence of antibiotic (A) and heavy metal (B) resistance genes in *S. maltophilia* strains.

A positive amplification with primers specific to the *qnrB* gene, potentially allowing resistance to quinolones, was obtained for all the strains isolated from Ouagadougou, most of the strains isolated from Nabeul (76 %) and hospital strains (strains from CF individuals: 83 %, from patients: 80 %). Only 21 % of strains isolated from Pierrelaye had this gene. *qnrB* was absent in all the strains from Feucherolles. A positive amplification with primers specific to *blaL2*, encoding a β -lactamase, was observed for all strains from Ouagadougou and most of the strains from Pierrelaye (79 %) and the hospital strains (CF individuals: 92 %, patients: 93 %). Few strains from Nabeul and Feucherolles were positive for the presence of this gene (23 % and 8 %, respectively). A positive amplification with primers specific to the gene *smlt3652*, encoding a putative β -lactamase, was observed for most of the strains, i.e. all the hospital strains and strains from Pierrelaye, 87 % of strains from Ouagadougou, 82 % of strains from Nabeul and 77 % of strains from Feucherolles.

Concerning heavy metal resistance genes, a positive amplification with primers specific to the *copB* gene implicated in efflux pumps formation, potentially allowing copper resistance was obtained for most of the strains, i.e. all the strains isolated from infected patients and Ouagadougou, 93 % of strains from Pierrelaye, 92 % of strains from CF individuals, 88 % of strains from Nabeul and 77 % of strains isolated from Feucherolles (Figure 36B). A positive amplification with primers specific to the *czcA* gene implicated in efflux pump formation, potentially allowing cadmium, zinc and cobalt resistance, was obtained for all the strains isolated from CF individuals and Ouagadougou, for 93 % of strains from infected patients, 85 % of strains from Feucherolles, 82 % of strains from Nabeul and 50 % of strains from Pierrelaye. Few strains were positive for the amplification of the *czcC* gene, also implicated in efflux pump formation (6 % of strains from Nabeul and 7 % of clinical strains). Concerning *merA* gene, encoding a mercuric reductase which allows mercury resistance, its detection was more frequent in hospital strains (53 % and 33 % of strains isolated from infected patients and CF individuals, respectively) than in environmental strains (18 % of strains from Nabeul and 8 % of strains from Feucherolles). Surprisingly, several hospital strains possessing *merA* gene were not able to grow in presence of 10 μ M of Hg^{2+} .

DISCUSSION

S. maltophilia is known for a long time as an environmental species and has recently emerged as an opportunistic pathogen. Its success of adaptation in the hospital is mainly due to a high

multi-drug resistance capacity. Resistance capacity of environmental isolates is supposed to be as high as the one of clinical strains is. However few studies investigated multi-drug resistance capacity of environmental *S. maltophilia* isolates and explored the environmental conditions that could favor the selection and maintenance of this resistance. In the present work we observed a high diversity in antibiotic resistance profiles of both environmental and hospital strains (Figure 32A). Both environmental and hospital strains were able to resist from 1 to 15 antibiotics and strains resistant to all tested antibiotics (except trimethoprim + sulfamethoxazole) were found within each category (Figure 33A). However, strains from the hospital were more frequently antibiotic multi-resistant than environmental strains were since half of the environmental strains were not able to resist to more than 3 antibiotics and only 7 % of the hospital strains had this characteristic. Only one previous study aimed at evaluating differences in antibiotic resistance in both hospital and environmental isolates of *S. maltophilia* (Berg, *et al.*, 1999). The authors identified a high diversity of antibiotic resistance profiles, 34 profiles derived from the analysis of 40 strains, and failed to relate antibiotic profile to strain origin. Unlike in our study, clinical strains did not present higher antibiotic multi-resistance capacities than environmental ones. These contradictory results could be influenced by the composition of the strain collection. Studies aiming at comparing strains from the hospital and the environment are difficult to handle due to the difficulty to constitute a collection of representative strains from various environments inside and outside the hospital. Moreover, using strains from only one origin or specific niche could lead to biased results. As *S. maltophilia* is increasingly found in CF individuals, it seemed essential to include strains from CF individuals in our collection. As previously demonstrated (Canton, *et al.*, 2003), we observed that strains isolated from CF individuals were more frequently antibiotic resistant than strains from infected patients. Almost half of the strains isolated from infected patients did not resist to more than 6 antibiotics, since only one fourth of the strains isolated from CF patients presented this property (Figure 32B). It has also been reported for *Pseudomonas aeruginosa*, another opportunistic pathogen of major concern in CF individuals (Lambert, 2002) (Deredjian *et al.*, submitted) that strains isolated from CF individuals presented higher multi-resistance capacity. Selective pressure in CF lungs could be heavier in the CF patients since antibiotic therapy is often longer and heavier than in non-CF patients explaining that strains isolated from CF individuals were more frequently multi-resistant. This could also partly explain that hospital strains from our study were more frequently antibiotic multi-resistant, since hospital strains used in the study of Berg *et al.* (1999), were all isolated from non-CF patients. The composition of the environmental isolate collection can then

influence the final conclusions of the studies. In the study of Berg *et al.* (1999), most of the environmental strains (14/20) were isolated from the rhizosphere. This ecological niche is generally considered as an antibiotic rich environment due to microbial competition which could explain that these strains were as resistant to antibiotics as clinical ones are (Berg, *et al.*, 2005). However, soil microbial community could be very variable depending on the plants or the physicochemical characteristics of the soils and no additional information concerning the origin of these strains were available (i.e. from the same rhizosphere, from the rhizosphere of different plants...). The originality of our study was to include in our collection environmental strains isolated from well characterized soils (Table 9) presenting very different characteristics due to their different geographical origin (France, Tunisia and Burkina Faso) and to anthropogenic practices (irrigation or organic amendments) influencing physicochemical and microbiological characteristics of the soils. Among environmental strains, antibiotic resistance capacities were very heterogeneous. Strains isolated from the French sites of Feucherolles and Pierrelaye represented all the environmental strains that were not able to resist to more than 3 antibiotics. Strains isolated from the Tunisian site of Nabeul presented intermediate antibiotic resistance capacities (from 4 to 12 antibiotics). Finally, strains from Ouagadougou (Burkina Faso) presented high antibiotic resistance capacities and were able to resist to more than 10 antibiotics. Differences observed between strains from the different sites could be explained by the adaptation to the different biotic and abiotic properties of the soils as pH, moisture concentration, presence of nutrients and type of crop. These differences could also be related to the different agricultural practices that lead to the intake of various contaminants which could act as pressure for antibiotic resistance selection. Antibiotics, antiseptics, heavy metals or organic compounds are suggested to be implicated in antibiotic resistance acquisition or maintenance in the environment by direct selection (antibiotics) or co-selection of resistance mechanisms (Filali, *et al.*, 2000, Berg, *et al.*, 2005, Achudume & Olawale, 2009). Absence of antibiotic resistance in strains isolated from the site of Feucherolles suggested that no selective pressure were present to the acquisition or maintenance of antibiotic resistance. This result could be expected since this site is an experimental site highly controlled with no known contamination. Irrigation with wastewater in the site of Nabeul or amendments with urban rough waste in the site of Ouagadougou could be responsible of the intake of molecules that create a stress in the indigenous microbial community and lead to strategy such as resistance mechanisms acquisition to survive. On the opposite, absence of resistance in the site of Pierrelaye was rather unexpected because this site had been irrigated with wastewater during near a century and is highly contaminated with

heavy metals (Bourennane, *et al.*, 2006). Our results contrast with a recent study conducted in a highly heavy metal contaminated site near an industrial area in Yskenderun Bay (Turkey). The authors showed the presence of antibiotic multi-resistant *S. maltophilia* (Matyar, *et al.*, 2008) which were also characterized by a high heavy metal resistance capacity, suggesting that heavy metal and antibiotic resistance could be co-selected in this species. Two hypotheses could explain our results. Either indigenous *S. maltophilia* population did not acquire antibiotic resistance by co-selection and only acquired resistance to heavy metals under heavy metal pressure or heavy metals in this particular soil are not available for the microbial community.

In order to test the effect of different anthropogenic pressures on heavy metal and antibiotic resistance co-selection in *S. maltophilia*, heavy metal resistance capacity has also been investigated in the strain collection. As we observed for antibiotic resistance, hospital strains were more resistant to heavy metals than environmental strains if we consider the whole groups (Figure 34A). However, if we consider environmental sub-groups, we observed that some environmental sub-groups were as resistant to heavy metals as hospital strains were (Figure 34B). A principal component analysis realized with antibiotic and heavy metal resistance phenotypes revealed that strains grouped depending on their origin and that heavy metal resistance was always associated to antibiotic resistance (Figure 35). A first group was defined by strains presenting little resistance to both antibiotics and heavy metals. These strains were all isolated from the French sites of Feucherolles and Pierrelaye. Less than one fourth of the strains from the experimental site of Feucherolles were resistant to Zn and Cd (figure 34B), confirming the absence of selective pressure in this site. Less than one fourth of the strains from Pierrelaye was resistant to only one metal (Cu) (Figure 34B), favoring the hypothesis of the non-availability of the heavy metals present in high concentration in this site for the microbial community. This non-availability could be explained by the interaction of the heavy metals with organic molecules which are also in high concentration in this site (Calace & Petronio, 2004, Kumpiene, *et al.*, 2008). A second group was composed of strains highly resistant to antibiotics, especially aminoglycosides and polypeptides, but not to heavy metals. These strains were isolated from the hospital (CF individuals and infected patients) and from the sites of Nabeul and Ouagadougou. Finally a third group was composed of strains resistant to both antibiotics and heavy metals, isolated from the hospital and the site of Nabeul. In the hospital, presence of Cu or Hg in disinfectants could act as selective pressure leading to heavy metal resistance acquisition. Presence of Zn in eluates of siliconized latex catheter has been found to increase zinc, cadmium and cobalt resistance in the opportunistic

pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (Conejo, *et al.*, 2003). Increase of resistance to the imipenem antibiotic was also observed and resulted from a co-regulation phenomenon (Perron, *et al.*, 2004). Effect of zinc on imipenem resistance has also been observed in *S. maltophilia* (Cooke, *et al.*, 1996). However, this result could be essentially explained by the activation of metallo- β -lactamases. Heavy metal resistance could also be selected indirectly under antibiotic selective pressure. For instance mercury resistance determinants are frequently found on mobile genetic elements and could be associated to antibiotic resistance determinants (Liebert, *et al.*, 1999). Acquisition of mobile element bearing both mercury and antibiotic resistance determinants could be acquired in response to antibiotic pressure. This hypothesis could explain the fact that mercury resistance genes are frequently found in hospital strains of our study despite their incapacity of growing in presence of 10 μ M of Hg. Mercury resistance determinants could be maintained despite their ineffectiveness due to their association with effective antibiotic determinants. Concerning environmental strains, their grouping depending on their original niche supported the hypothesis of a high adaptation of the strains to their environment. *S. maltophilia* is considered as an indigenous population of soils (Deredjian *et al.*, submitted). Durable installation in soils presenting very different characteristics could lead to adaptation of the population to the encountered conditions. These different characteristics was first due to the different geographical origins of the soils since strains from French sites were characterized by low resistance capacity and the strains from the African sites presented high resistance capacity especially for antibiotics. Secondly, anthropogenic activities could also participate to the different phenotypes observed due to the intake of contaminants that could favor both antibiotic and heavy metal resistance acquisition, independently or by a co-selection phenomenon. *S. maltophilia* genome is characterized by numerous determinants encoding non specific efflux pumps that could participate to resistance co-selection by a cross-resistance phenomenon (Crossman, *et al.*, 2008). We also observed that antibiotic and heavy metal resistance phenotypes enable to separate the two sequenced strains, i.e. the clinical K279a strain and the environmental R551-3 strain, in two different groups, despite a high synteny, a core genome composed of 85 % of common genes between the two strains and a high number of drug resistance determinants (Rocco, *et al.*, 2009). The K279a strain belonged to the group of strains characterized by an elevated multi-resistance capacity whereas the R551-3 strain belonged to the group defined by heavy metal and antibiotic resistance capacity. This observation suggested that adaptation to the niche could lead to different phenotypes despite a high degree of genome conservation. The difference observed between the two strains could be due to the presence of resistance

determinants in the accessory genome, i.e. acquired by horizontal transfer, or by regulation phenomenon.

Presence of antibiotic and heavy metal resistance genes was investigated in the strain collection in order to evaluate their implication in the observed phenotypes. Our objective was not to evaluate the presence of all resistance genes but to evaluate the prevalence of genes implicated in different resistance mechanisms as genes encoding efflux pumps (*smeV*, *copB*, *czcA*, *czcC*), enzymes which modify antibiotics or metals (*smlt3652*, *blaL2*, *merA*), peptide which protects antibiotic targets (*qnr*). Indeed, resistance to each antibiotic family involves several mechanisms. Our choice was also based on the potential mobility of some genes as for example *czc*, *cop* and *mer* operon are present on genomic islands in the sequenced strains (Crossman, *et al.*, 2008, Rocco, *et al.*, 2009). The distribution of these genes was variable (Figure 36). Presence of antibiotic resistance genes was frequent in hospital strains and strains from Ouagadougou. In strains from Nabeul and Pierrelaye, the prevalence of the genes was high except for *blaL2* and *qnr*, respectively. The lowest prevalences were observed in strains isolated from Feucherolles. Concerning heavy metal resistance genes, presence of *copB* and *czcA* was frequent in all the strains and presence of *czcC* and *merA* was less frequent. Absence of amplification could be explained by the absence of the genes, but we can not exclude a problem during the PCR amplification, probably due to a poor effectiveness of the primers during the hybridizing step (due to mutation in the hybridizing zone). It seems difficult to conclude that presence or absence of these genes could be responsible to the diversity of resistance phenotype observed. Variation in resistance phenotype could more probably be the result of mutation or regulation phenomenon, as it has been suggested in clinical isolates (Sanchez, *et al.*, 2004, Sanchez & Martinez, 2009). Evaluation of the expression of resistance genes would be necessary to better understand resistance mechanism functioning in *S. maltophilia*. Nevertheless, this genotypic variability also reflected a high diversity among *S. maltophilia* strains. We previously investigated heavy metal resistance capacity and presence of implicated genes in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (Deredjian *et al.*, submitted). We observed that *P. aeruginosa* showed variable heavy metal resistance phenotypes despite the presence of potentially implicated genes (*copA*, *copB*, *czcA*) in all the hospital and environmental strains of the collection. These results suggested that all the strains have potentially the capacity to resist to heavy metals and that the variability in resistance capacity was preferentially due to regulation and level of expression of the genes. In *S. maltophilia*, the phenotypic diversity observed could also be due to a genotypic diversity (presence / absence of researched genes) that could be related to adaptation of *S. maltophilia*

populations to conditions present in their original niches. Molecular methods as pulse field gel electrophoresis (PFGE) after digestion with *DraI* revealed a high diversity among *S. maltophilia* strains. Some of them enable to differentiate clinical strains from environmental strains (Minkwitz & Berg, 2001), others grouped strains independently of their origin (Berg, *et al.*, 1999). To our opinion, it is more important to take into account the conditions that characterized the original niche of the strains than to differentiate strains from the environment and from the hospital. Work on strains from well characterized environments is indispensable to evaluate *S. maltophilia* population diversity as this species seems highly adapted to its original niche.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a CORUS project of the French “Ministère des Affaires étrangères” and a EC2CO project supported by the INSU and INEE departments of CNRS. A. Deredjian was funded by a grant from the CNRS. We thank participants of the CORUS and EC2CO projects for soil sampling. We thank the PARMIC technical platform and Rhône-Alpes Region Cluster “Environnement”. We thank Gerard Chabanon and Christine Segonds for providing clinical strains of *S. maltophilia*.

REFERENCES

- Achudume AC & Olawale JT (2009).** Occurrence of antibiotic resistant bacteria in waste site of Ede south west Nigeria. *J Environ Biol* 30: 187-189.
- Alonso A, Sanchez P & Martinez JL (2001).** Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 3: 1-9.
- Avison MB, von Heldreich CJ, Higgins CS, Bennett PM & Walsh TR (2000).** A TEM-2beta-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 46: 879-884.
- Berg G, Roskot N & Smalla K (1999).** Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* 37: 3594-3600.

Berg G, Eberl L & Hartmann A (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* 7: 1673-1685.

Berg J, Tom-Petersen A & Nybroe O (2005). Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett Appl Microbiol* 40: 146-151.

Bourennane H, Dere C, Lamy I, Cornu S, Baize D, van Oort F & King D (2006). Enhancing spatial estimates of metal pollutants in raw wastewater irrigated fields using a topsoil organic carbon map predicted from aerial photography. *Sci Total Environ* 361: 229-248.

Calace N & Petronio BM (2004). The role of organic matter on metal toxicity and bio-availability. *Ann Chim* 94: 487-493.

Canton R, Valdezate S, Vindel A, Sanchez Del Saz B, Maiz L & Baquero F (2003). Antimicrobial susceptibility profile of molecular typed cystic fibrosis *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and differences with noncystic fibrosis isolates. *Pediatr Pulmonol* 35: 99-107.

Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM & Wu WJ (2004). Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 53: 518-521.

Conejo MC, Garcia I, Martinez-Martinez L, Picabea L & Pascual A (2003). Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2313-2315.

Cook PP, Catrou PG, Christie JD, Young PD & Polk RE (2004). Reduction in broad-spectrum antimicrobial use associated with no improvement in hospital antibiogram. *J Antimicrob Chemother* 53: 853-859.

Cooke P, Heritage J, Kerr K, Hawkey PM & Newton KE (1996). Different effects of zinc ions on in vitro susceptibilities of *Stenotrophomonas maltophilia* to imipenem and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2909-2910.

Crossman LC, Gould VC, Dow JM, et al. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9: R74.

D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW & Wright GD (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311: 374-377.

Dungan RS, Yates SR & Frankenberger WT, Jr. (2003). Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment. *Environ Microbiol* 5: 287-295.

- Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M & Blaghen M (2000).** Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr Microbiol* 41: 151-156.
- Flores MR, Ordoñez OF, Maldonado MJ & ME. F (2009).** Isolation of UV-B resistant bacteria from two high altitude Andean lakes (4,400 m) with saline and non saline conditions. *J Gen Appl Microbiol*. 55: 447-458.
- Jones RN, Sader HS & Beach ML (2003).** Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents* 22: 551-556.
- Juhász AL, Stanley GA & Britz ML (2000).** Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Lett Appl Microbiol* 30: 396-401.
- Juhnke ME & des Jardin E (1989).** Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Appl Environ Microbiol* 55: 747-750.
- Kumpiene J, Lagerkvist A & Maurice C (2008).** Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments--a review. *Waste Manag* 28: 215-225.
- Lambert PA (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 95 Suppl 41: 22-26.
- Liebert CA, Hall RM & Summers AO (1999).** Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 507-522.
- Lin CW, Chiou CS, Chang YC & Yang TC (2008).** Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Lett Appl Microbiol* 47: 393-398.
- Martinez JL (2009).** Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157: 2893-2902.
- Matyar F, Kaya A & Dincer S (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci Total Environ* 407: 279-285.
- Minkwitz A & Berg G (2001).** Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* 39: 139-145.
- Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL & Kohler T (2004).** CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279: 8761-8768.

- Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B & Saiman L (2009).** Respiratory Microbiology of Patients With Cystic Fibrosis in the United States, 1995-2005. *Chest*.
- Ribbeck-Busch K, Roder A, Hasse D, de Boer W, Martinez JL, Hagemann M & Berg G (2005).** A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated *Stenotrophomonas rhizophila*. *Environ Microbiol* 7: 1853-1858.
- Rocco F, De Gregorio E, Colonna B & Di Nocera PP (2009).** *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: A start-up comparison. *Int J Med Microbiol*.
- Romanenko LA, Uchino M, Tanaka N, Frolova GM, Slinkina NN & Mikhailov VV (2008).** Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. *Arch Microbiol* 189: 337-344.
- Romano G, Stampi S, Zanetti F, De Luca G & Tonelli E (1997).** Occurrence of gram-negative bacteria in drinking water undergoing softening treatment. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 200: 152-162.
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, et al. (2009).** The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7: 514-525.
- Sanchez MB & Martinez JL (2009).** SmQnr contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 580-581.
- Sanchez MB, Hernandez A & Martinez JL (2009).** *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiol* 4: 655-660.
- Sanchez P, Alonso A & Martinez JL (2004).** Regulatory regions of *smeDEF* in *Stenotrophomonas maltophilia* strains expressing different amounts of the multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2274-2276.
- Slama TG (2008).** Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care* 12 Suppl 4: S4.
- Stepanauskas R, Glenn TC, Jagoe CH, Tuckfield RC, Lindell AH & McArthur JV (2005).** Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ Sci Technol* 39: 3671-3678.
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, et al. (2009).** Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75: 748-757.
- Thioulouse J & Lobry JR (1995).** Co-inertia analysis of amino-acid physico-chemical properties and protein composition with the ADE package. *Comput Appl Biosci* 11: 321-329.

Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN & Walsh TR (2007). Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. *Emerg Infect Dis* 13: 559-565.

Wright MS, Loeffler Peltier G, Stepanauskas R & McArthur JV (2006). Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiol Ecol* 58: 293-302.

Conclusions

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons évalué le rôle de différentes activités anthropiques sur la sélection de résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*.

Nous avons observé que la majorité des souches d'origine environnementale de *P. aeruginosa* présentait le phénotype sauvage de résistance aux antibiotiques (résistance à la minocycline et au triméthoprime + sulfaméthoxazole, sensibilité à la colistine). A l'opposé, 60 % des souches d'origine hospitalière présentent un phénotype résistant, présentant des résistances de 3 à 17 antibiotiques (sur 18 testés), ce qui confirme que la forte concentration en antibiotiques présente dans le milieu hospitalier constitue la pression majeure pour l'acquisition et le maintien de résistance aux antibiotiques. Toutefois, 12 % des souches d'origine environnementale présentent un phénotype résistant, présentant de 3 à 5 résistances. Les souches présentant ces résistances ont été soumises à la présence dans leur niche d'origine d'hydrocarbures ou d'antiseptiques qui pourraient avoir agi comme pression favorisant la sélection et / ou le maintien de ces résistances. Toutefois, nous ne bénéficions pas d'une caractérisation assez fine de ces environnements pour confirmer cette hypothèse. En ce qui concerne la résistance aux métaux, les souches environnementales présentent plus fréquemment des résistances au zinc, cadmium et faible concentration en cuivre alors que les souches d'origine hospitalière présentent plus fréquemment des résistances au mercure et aux fortes concentrations en cuivre. Pourtant, nous avons pu observé la présence des gènes impliqués dans la résistance au Zn, Cd et Cu chez toutes les souches étudiées qu'elles soient d'origine environnementale ou hospitalière, ce qui suggère que les différents phénotypes observés s'expliqueraient plutôt par des différences dans l'expression et la régulation de ces gènes. Cette étude ne nous a pas permis de mettre en évidence d'association de résistance aux métaux et aux antibiotiques. Toutefois, les environnements étudiés n'étaient pas caractérisés par de fortes concentrations en métaux comme c'est le cas dans les rares études montrant ce type d'association chez des souches environnementales de *P. aeruginosa* (Filali, *et al.*, 2000, Oyetibo, *et al.*, 2009).

Les souches de *S. maltophilia* présentent également des capacités de résistance différentes en fonction de leur origine, contrairement à ce qui est suggéré dans la littérature (Berg, *et al.*, 1999). Les souches hospitalières présentent fréquemment des multi-résistances aux antibiotiques mais contrairement aux souches cliniques de *P. aeruginosa*, ces résistances sont

parfois associées à une forte capacité de résistance aux métaux. La présence de fortes concentrations en antibiotiques dans le milieu hospitalier est très certainement à l'origine de la sélection et du maintien de ces résistances. Des différences ont également été mises en évidence entre les deux modèles en ce qui concerne les souches d'origine environnementale. En effet, chez les souches d'origine environnementale de *S. maltophilia*, nous avons pu observer une grande diversité des profils de résistance aux métaux et aux antibiotiques en fonction des sites d'origine des souches. D'une part, les souches isolées des sites de Nabeul (Tunisie) présentent des capacités similaires à celles des souches d'origine hospitalière, se répartissant en 2 groupes : le premier caractérisé par des résistances fréquentes aux métaux et aux antibiotiques ; le deuxième caractérisé par des résistances à un grand nombre d'antibiotiques (en particulier aminosides et polypeptides) mais pas aux métaux. Les souches isolées du site de Ouagadougou font également partie de ce dernier groupe de souches. D'autre part, un troisième groupe, uniquement constitué de souches environnementales isolées des sites de Feucherolles et Pierrelaye (France), se caractérise par de faibles capacités de résistance à la fois aux antibiotiques et aux métaux. Ces résultats suggèrent une adaptation particulière des populations de chaque site aux conditions environnementales rencontrées. Ces conditions sont en effet très différentes d'un site à l'autre soit de part leurs origines géographiques différentes (France et Afrique) soit du fait des pratiques agricoles conduites sur ces sites. En effet, l'utilisation d'eaux usées pour l'irrigation sur le site de Nabeul et de déchets urbains bruts pour amender les sols de Ouagadougou pourraient apporter différents contaminants comme des métaux lourds, des molécules organiques complexes mais également des antibiotiques ou des antiseptiques pouvant exercer une pression sélective même à faible concentration. Cependant, il est à noter que ces sols ne renferment pas de concentrations élevées en métaux. Par conséquent, un lien direct entre concentration totale en métaux et niveau de résistance n'a pas pu être mis en évidence. La double résistance métaux / antibiotiques est soit une capacité développée au cours de l'exposition aux métaux présents dans les eaux d'irrigation ou dans les déchets urbains, soit une caractéristique intrinsèque des populations indigènes de *S. maltophilia* liée à l'adaptation à leur niche. La présence dans les génomes séquencés de nombreux gènes impliqués dans la formation de pompes à efflux non spécifiques pourraient entraîner des phénomènes de résistance croisée en permettant l'efflux de métaux et d'antibiotiques. L'absence de résistance aux métaux et aux antibiotiques des souches isolées du site de Pierrelaye est plutôt inattendue étant donné que ce site est caractérisé par des concentrations en métaux très élevées du fait de l'utilisation des eaux usées de la ville de Paris pendant près d'un siècle pour l'irrigation des champs. Toutefois, les

propriétés de ce sol pourraient être à l'origine de la non-disponibilité des métaux (surtout du fait de la présence de molécules organiques) les rendant moins toxiques pour les organismes présents, ce qui expliquerait l'absence de résistances chez les souches isolées de ce site.

Cette diversité de résistance est plutôt inattendue si on considère les résultats de comparaison des génomes. En effet, une importante capacité de résistance aux composés toxiques a été mise en évidence à la fois chez la souche d'origine clinique K279a et la souche d'origine environnementale R551-3. Ce trait commun permettrait aux souches de *S. maltophilia* de coloniser différentes niches, à la fois dans le milieu clinique et dans l'environnement quelle que soit l'origine de la souche. Toutefois, la souche R551-3 est endophyte du peuplier, elle établit donc une interaction particulière avec cet organisme et ne peut donc pas être considérée comme le meilleur représentant des souches d'origine environnementale. De plus, nous avons pu constater que l'analyse en composantes principale établie avec les phénotypes de résistance aux métaux et aux antibiotiques permettait de séparer ces souches dans deux groupes différents, la souche K279a appartenant au groupe caractérisé par une forte capacité de multi-résistance aux antibiotiques et la souche R551-3 appartenant au groupe caractérisé par une résistance importante aux métaux et aux antibiotiques. Ainsi, malgré une conservation importante entre les deux génomes (85 %), des phénotypes différents sont observés. Des différences d'expression et de régulation des gènes communs de même que le génome accessoire, c'est-à-dire spécifique à chaque souche et acquis par transfert horizontal, pourraient expliquer les différences observées entre les deux souches.

Nous avons également observé que la prévalence des gènes de résistance aux métaux et aux antibiotiques est variable indépendamment de l'origine des souches, ce qui ne permet pas de conclure sur le rôle de la présence de ces gènes sur les phénotypes obtenus. Ce résultat traduit toutefois une diversité génotypique que nous n'avons pas observée chez *P. aeruginosa*. En effet, les gènes de résistance aux métaux recherchés chez *P. aeruginosa* sont présents chez toutes les souches. Ceci suggère que toutes ces souches auraient potentiellement la capacité de résister aux métaux et que les différences observées seraient plutôt liées à des différences de régulation et des niveaux d'expression différents de ces gènes en fonction des conditions environnementales rencontrées dans la niche d'origine. Chez *S. maltophilia*, l'adaptation aux conditions rencontrées par les différentes populations étudiées pourrait également être à l'origine d'une diversité intra-spécifique au niveau des génotypes.

Conclusion (English version)

In the first part of this chapter, we evaluated the role of different human activities on antibiotic resistance selection in *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. We observed that most of environmental *P. aeruginosa* strains presented the wild type resistance phenotype (minocycline resistance, trimethoprim + sulfamethoxazole resistance and colistin sensitivity). On the opposite, 60 % of hospital strains presented a resistant phenotype, exhibiting resistance from 3 to 17 antibiotics (of 18 tested), confirming that the high antibiotic concentrations in the hospital is the major pressure for the acquisition and maintenance of antibiotic resistance. However, 12 % of environmental strains presented a resistant phenotype, exhibiting from 3 to 5 resistances. Strains presenting these resistances were submitted in their original niche to the presence of hydrocarbons or antiseptics that could act as selective pressure favouring this resistance selection and / or maintenance. However, the characterization of these environments is not good enough to confirm this hypothesis. Concerning heavy metal resistance, environmental strains were frequently resistant to zinc, cadmium and low concentration of copper since hospital strains were frequently resistant to mercury and high concentration of copper. Nevertheless, we observed the presence of zinc, cadmium and copper resistance genes in all the strains from environmental and hospital origin, suggesting that phenotypic differences could be explained by difference in the level of expression of these genes or in their regulation. This study did not enable to evidence association between antibiotic and heavy metal resistance. However, the studied environments were not characterized by high heavy metal concentration as it has been seen in the scarce study showing such associations in environmental strains of *P. aeruginosa* (Filali, *et al.*, 2000, Oyetibo, *et al.*, 2009).

S. maltophilia strains also present different capacity of resistance depending on their origin, unlike it has been suggested in the literature (Berg *et al.*, 1999). Hospital strains presented frequently antibiotic multi-resistance. Unlike *P. aeruginosa*, antibiotic resistance is sometimes associated to high heavy metal resistance capacity. The presence of high antibiotic concentrations in the hospital must be responsible for selecting and maintaining resistance. Differences among the two models were shown within environmental strains. We observed a high diversity in antibiotic and heavy metal resistance profiles among environmental strains of *S. maltophilia*. In one hand, strains isolated from the site of Nabeul (Tunisia) presented resistance capacities similar to hospital strains, forming two groups. The first one is

characterized by frequent antibiotic and heavy metal resistances and the second one is characterized by resistance to a higher number of antibiotics (especially, aminoglycosides and polypeptides) but low heavy metal resistance. Strains isolated from Ouagadougou were also grouped in the last group. Finally a third group, only composed with environmental strains from the French sites of Feucherolles and Pierrelaye, is characterized by low antibiotic and heavy metal resistance capacities. These results suggest a particular adaptation to environmental conditions of *S. maltophilia* populations within in each site. These conditions are indeed very different from one site to another due to their different geographical origin (France and Africa), climate, and physicochemical characteristics or to agricultural practices conducted on these sites. The use of wastewater to irrigate the site of Nabeul or urban rough waste to amend the site of Ouagadougou could lead to the intake of contaminants as heavy metals or organic compounds but also antibiotics or antiseptics that can act as selective pressure even at low concentration. However, it should be noted that these soils do not contain high concentrations of metals. Therefore, a direct link between total metal concentration and level of resistance has not been demonstrated. The double resistance to metals / antibiotics could be a capacity developed during the exposition to heavy metals in wastewater or urban rough waste or could be an intrinsic characteristic of indigenous *S. maltophilia* populations linked to the adaptation to the niche. Presence in the genome of numerous genes implicated in the formation of non specific efflux pumps could lead to cross-resistance enabling the efflux of both metals and antibiotics. Absence of metal and antibiotic resistance in strains from the site of Pierrelaye was rather unexpected since this site is characterized by high heavy metal concentrations due to the use of the untreated wastewater from Paris over a century for the irrigation of the crops. However, properties of the soil could lead to the non-availability of heavy metals (due to the presence of organic molecules) making them less toxic for the present organisms, and could explain absence of resistance in strains from this site.

This diversity was rather unexpected if we consider the results of comparison of the genomes. A high capacity of resistance to toxic compounds has been highlighted in both the clinical strain K279a and the environmental strain R551-3. This common characteristic would enable strains of *S. maltophilia* to colonize different niches in both the hospital and the environment, independently of the origin of their origin. However, R551-3 is a poplar endophyte and establishes particular interactions with this organism. So, this strain can not be considered as the best representative of environmental strains. Moreover, we observed that the principal component analysis established with antibiotic and heavy metal resistance profiles enable to separate these strains in two different groups, K279a belonging to the group characterized by

high antibiotic multi-resistance capacity and R551-3 belonging to the group characterized by high heavy metal and antibiotic resistance capacity. Despite a high conservation between the two genomes (85 %), different phenotypes were obtained. Differences in expression and regulation of implicated genes, as well as the accessory genome, specific to each strain and acquired by horizontal transfer, could explain the differences observed between the two strains.

We also observed that the prevalence of antibiotic and heavy metal resistance genes was variable, independently of the origin of *S. maltophilia* strains. This result does not enable to conclude on the role of the presence of these genes in the observed phenotypes. However, this result reflects a genotypic diversity that we did not observe in *P. aeruginosa*. Heavy metal resistance genes in *P. aeruginosa* are present in all the strains. This suggests that these strains would be potentially able to resist to metals and that the observed differences are rather related to differences in regulation and different levels of expression of these genes due to environmental conditions encountered in the original niche. In *S. maltophilia*, adaptation to conditions encountered by the different studied populations could also be responsible of intra-specific diversity at the genotype level.

Partie 2 : Evaluation de la diversité du déterminant *merA* chez *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*, association avec les résistances aux antibiotiques

Part 2: *merA* genetic diversity in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* and relationship with antibiotic resistance

“*merA* genetic diversity in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* and relationship with antibiotic resistance”

Amélie Deredjian^{*}, Elisabeth Brothier, Sabine Favre-Bonté, and Sylvie Nazaret

Université de Lyon, France; Research Group on « Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment », CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, and Université Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne, France.

Short running title: *merA* diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*

Key-words: *merA*, antibiotic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, hospital origin, environment

^{*}Corresponding author. Mailing address: Université de Lyon, France; Research Group on « Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment », CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, and Université Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne, France.

ABSTRACT

The frequent presence of *mer* operon within bacterial isolates from the hospital raise the question of the selective pressure acting on the persistence of *merA* gene since mercury is forbidden for several years in hospital. The frequent association of antibiotic resistance genes and *mer* operon on mobile genetic elements suggests that antibiotic favor the dissemination of both classes of genes. To investigate this further we conducted a study on strains of two human opportunistic pathogens *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* originating either from the hospital environment, patients from the hospital, cystic fibrosis patients, waste water and soil. Prevalence and diversity of *merA* gene were evaluated and compare to antibiotic susceptibility profiles. Common *merA* determinants showing 100% homology with *merA* carried by the Tn501 or PGI-2 genomic island were found among *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. Within each species these determinants were found the most frequent among both hospital and environmental strains of each species but were more widespread among hospital environment and hospital patients. Two of the most prevalent *merA* determinants were associated to particular antibiotic resistance profiles in *P. aeruginosa* strains from the hospital.

INTRODUCTION

The mercury resistance (*mer*) operon is widely distributed among many bacterial taxa belonging to Proteobacteria, Gram-positive bacteria and Archaeobacteria. The *mer* operon, is composed at least by four genes: *merR* which activates its transcription in presence of mercury and represses it in absence of mercury; *merT* and *merP*, two transporters of Hg^{2+} from the periplasm to the mercuric reductase encoding by *merA*, which reduces Hg^{2+} to volatile Hg^0 . Other genes can be present like the down-regulator *merD* and the transporters *merC* and *merF* (Nascimento & Chartone-Souza, 2003). This operon is frequently found on mobile elements like plasmid, transposon or genomic island (Mindlin, *et al.*, 2001). Many studies focused on its role in the biogeochemical cycle of mercury as well as its role in the adaptation of bacterial communities exposed to mercury pollution. Natural events like volcanic eruptions or anthropogenic activities like gold mining, chlor-alkali production and sewage treatment were found to impact bacterial communities whose adaptation process led to an increase in the abundance of mercury resistant populations and an increase in *mer* gene containing bacteria. The long time use of mercury as disinfectant, in thermometers or in dental amalgams was also found responsible of such an enrichment in the hospital environment (Summers, *et al.*, 1993, Ready, *et al.*, 2007). These enrichments might result from selection and multiplication of *mer*-gene containing populations as well as from acquisition of mercury resistance by horizontal gene transfer (HGT). These HGT can be associated to acquisition of other genes present on the mobile element, especially genes encoding antibiotic resistance (Liebert, *et al.*, 1999). Links between mercury and antibiotics resistance have already been demonstrated in studying bacterial communities living in polluted environments and in the oral or fecal flora after amalgam installation (Wireman, *et al.*, 1997).

Exposure to mercury is a driving force for the carriage of *mer* genes. Its frequent association to antibiotic resistance gene on mobile elements suggests that antibiotic pressure contribute to the acquisition and dissemination of *mer* gene. The simultaneous acquisition of mercury and antibiotic resistance genes can play a significant role in antibiotic multi-resistance especially in opportunistic pathogens, which can be found in both clinical and environmental ecosystems. *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* are two opportunistic pathogens, known as versatile micro-organisms. These ubiquitous bacteria are characterized by high capabilities to adapt to a variety of environments; *S.maltophilia* is often present in soils (Juhnke & des Jardin, 1989), but can be found in water (Matyar, *et al.*, 2008)

while *P. aeruginosa* has been found in soils only in particular cases in highly polluted sites (Kaszab, *et al.*, 2009) and is predominantly found in water and wet environments (Pellett, *et al.*, 1983). Some of their metabolic activities have been studied for bioremediation applications (Hickey & Focht, 1990, Binks, *et al.*, 1995). They can also establish beneficial or pathogenic interactions with plants or animals (Denton, *et al.*, 1998, Berg, *et al.*, 2005). Finally, they are implicated in nosocomial infections in fragilised people and can infect respiratory tract of patients with cystic fibrosis (Denton, *et al.*, 1998). They present frequently multi-resistance to antibiotics, making them difficult to eradicate (Mesaros, *et al.*, 2007, Nicodemo & Paez, 2007).

Acquisition of mobile genetic elements seems to play an important role in the versatility of these two bacteria. *P. aeruginosa* genome size can vary from 5.2 to 7 Mbp. Variability in size can be explained by loss or acquisition of genetic elements by horizontal gene transfers. These blocks of genes are known as the accessory genome, positioned in specific points of the core genome and represent regions of plasticity (Morales, *et al.*, 2004). Among these elements, several genomic islands have been described: PAGI-1 to 11 (*Pseudomonas aeruginosa* genomic islands) (Larbig, *et al.*, 2002, Battle, *et al.*, 2009) or PAPI-1 and PAPI-2 (*Pseudomonas aeruginosa* pathogenic island) (He, *et al.*, 2004). Concerning *S. maltophilia*, 40 genomic islands have been identified in the genome of the two sequenced strains: the clinical K279a (Crossman, *et al.*, 2008) and the environmental R551-3 (Taghavi, *et al.*, 2009). These islands are implicated in the high effectiveness of *S. maltophilia* in interactions and protection in several environments, encoding type I and IV secretion systems, genes implicated in LPS biosynthesis and in metal resistance like mercuric resistance genes.

In previous works, *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* strains originating from the hospital or the environment were characterized for their mercury resistance phenotype and their carriage of a *merA*-like gene. Here we aimed at evaluating the extent of the diversity of *merA*-like genes based on restriction analysis and sequencing and its localization on the bacterial genome i.e. chromosome or plasmid carriage. The results were analyzed and discussed in comparison with data on antibiotic susceptibilities and selective pressure existing in the original niche of the various strains.

MATERIALS AND METHODS

Strains

A collection of 127 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and 79 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* was used in this study (Table 11). These strains were chosen taking into account their origin and the putative anthropogenic selective pressure (i.e. antibiotics, antiseptics, hydrocarbons, heavy metals) present in their original niche. Strains of *P. aeruginosa* were isolated from the hospital environment (16), faecal carrier patients (5), infected patients (8) or cystic fibrosis patients (25). A set of environmental strains (73) from water samples (14), from soil related samples (46) and from snake breeding (13) were also included. Similarly strains of *S. maltophilia* were either from human origin (28) including infected patients (16) and CF patients (12) or environmental origin (39). The later were isolated from soil samples from France (27) and Africa [Tunisia (18) and Burkina Faso (8)].

Mercury resistance and antibiotic resistance tests

Mercury resistance was established using Tryptic Soy Agar media diluted 10 fold (TSA 1/10) supplemented with different concentrations (10, 50, 200, 500 μ M) of Hg(II), adding as mercury salt (HgCl_2). Cultures were incubated at 28°C during seven days. A strain was considered as resistant when growth on medium supplemented with 10 μ M of Hg(II) was equivalent to growth on medium without mercury. When growth was lower, the resistance was intermediate. When no growth was obtained, the strain was sensitive. In order to make a link between mercury resistance and antibiotic resistance, antibiotic resistance profiles were established. Minimal inhibitory concentrations of 18 antibiotics were obtained using the VITEK®2 system (Biomérieux, France) with AST-N032 card (specific of non fermenting gram negative bacteria) were performed and results analysed as previously reported (Deredjian *et al.*, submitted).

PCR amplification

The degenerated primers merA1GN (5'-GTG CCG TCC AAG ATC ATG AT-3') and merdA2 (5'-TAG CC(C/T) AC(G/A) GT(C/G) GC(C/G) AC(T/C) TG-3') were used to amplify *merA* gene (Table 12). These primers were designed after alignment of several *merA* sequences picked up from GenBank database including the *mer* determinants detected on the sequenced genomes of *P. aeruginosa* (strains PA7, PA14, LESB58) and *S. maltophilia* (K279).

Table 11. Strains used in this study.

Origin	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. maltophilia</i>
Environment		
Treatment plant system	poe1033, poe1108, poe1028, poe1314, poe1091, poe1062, poe1312, poe1045, poe1026, poe1372, poe1436, poe1150, poe1081, poe1302	
Soil related	ATCC14425, CFBP5031, CFBP5032, CFBP5033, CFBP5034, LMG5031, LMG5032, LMG5033, LMG1272, LMG6855, CFBP2466, CFBP5035, ATCC21776, ATCC31479, CIP104590, LMD5034, LMD68.7, LMG15153, 7NSK2, DSMZ6195, bpoe1457, bpoe1459, bpoe1460, bpoe1428, bpoe1429, bpoe1430, bpoe1431, bpoe1432, bpoe1433, bpoe1444, bpoe1445, bpoe1447, bpoe1454, bpoe1464, bpoe1465, bpoe1466, CFBP5036, CFBP5037, ATCC33988, bpoe1461 (Es40), bpoe1462 (Es41), bpoe1474, bpoe1475, bpoe1479, ATCC27014, bpoe1463	V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10, N11, N12, N13, N14, N15, N16, N17, O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8
Snake breedings	bpoe602, bpoe626, bpoe636, bpoe639, bpoe688, bpoe690, bpoe674, bpoe700, bpoe701, bpoe603, bpoe612, bpoe692, bpoe600	
Hospital		
Environment	poe9, poe92, poe110, poe101, poe22, poe45, poe59, poe17, poe1, poe2, poe81, poe30, poe103, poe77, poe64, poe131	
Patients	poe73, poe8, poe19, poe54, poe51, poe126, ATCC15691, ATCC27853, PA5, PA6, PA12, PA14, PAO1	I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8, I9, I10, I11, I12, I13, I14, I15
Cystic fibrosis individuals	bpoe977, bpoe979, bpoe980, bpoe981, bpoe982, bpoe983, bpoe984, bpoe5000, bpoe5001, bpoe5002, bpoe5003, bpoe5004, bpoe5005, bpoe5006, bpoe5007, bpoe5008, bpoe5009, bpoe5010, bpoe5011, bpoe5012, bpoe5013, bpoe5014, bpoe5015, bpoe5016, bpoe5017	CF1, CF2, CF3, CF4, CF5, CF6, CF7, CF8, CF9, CF10, CF11, CF12

Concerning *S. maltophilia* from soils, N = strains from Tunisian site (Nabeul), O = strains from Burkina Faso site (Ouagadougou) and V and P = strains from French sites (Feucherolles (Versailles) and Pierrelaye).

Table 12. List of primers.

ORF	Function	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Product size bp	Annealing temperature °C
<i>merA</i>	Mercuric reductase Putative metal transporter	GTGCCGTCCAAGATCATGAT	TAGCCYACRGTSGCSACYTG	933	57
<i>C22</i>	ATPase	CCTTCGTCCATTACCTGTGGAAC	AACTTGCGAGCCAACTCACG	943	63
<i>C81</i>	Hypothetical protein XF1761 Probable transcriptional regulator (PA3689)	TCGCCTTATCAACCCACCGC	TGTGGACCAGCGTCGATTCC	805	58
<i>C98</i>		ATGCGGATCGGTGAACTGGG	GTTGAGAATGCCGCACTCGC	375	58
<i>C105</i>	Hypothetical protein XF1781 Chromosome partitioning- related protein	GATTGATGCTCAACGACGATGG	GCTGTTCCGCCTTCAGTTCC	681	59
<i>C108</i>		ACTACGAACTGACCCAGCGC	CCATTGCGGGAACAACCTCGC	659	58

They were further tested on the determinants: Tn501, Tn21, pDU1358, pKLH2, pMERPH, pMER419, R831. Successful amplification was obtained with all targets tested excepted pMERPH with the *merA* primers (data not shown). The following PCR cycles was used to amplify a 930 bp segment of *merA* (total size 1686 pb): an initial denaturation step is done at 94°C during 4 min, followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min of primer annealing at 57°C (*merA*), 1 min of primer extension at 72°C. Finally, a final extension was done during 8 min at 72 °C. The presence of PAgI-2-like genomic islands was done by PCR with 5 pairs of primers amplifying specific genes of these islands. These primers were previously designed by Klockgether *et al.* and Finnan *et al.* (Table 12) (Finnan, *et al.*, 2004, Klockgether, *et al.*, 2008). PCR was done as follow: an initial cycle of denaturation during 4 min at 96°C, 30 cycles of a 30 s denaturation at 94°C, a 30 s annealing primers at variable temperature, a 1 min primer extension at 72°C, final extension was done at 72°C during 8 min. The PCR were carried out in 25 µl reaction mixture containing 1,25 U of *Taq* polymerase (Q-biogen), 1X reaction buffer containing MgCl₂ (Q-biogen), 20 mM dNTP, 0,5 µM of each primers, 1 µl of cell lysate. Amplification was verified by 2 % agarose gel electrophoresis.

Plasmid profile and Southern hybridization

Plasmid profiles were performed according to the procedure previously described (Moulton, *et al.*, 1993). The strain *P. aeruginosa* PAO1 and the strain *Pseudomonas syringae p. pisi* 203 were use as negative control and PA025 as a positive control for the absence and presence of *merA* gene, respectively, on all the gel electrophoresis. Profiles were separated on 0.6% w/vol agarose gels and the DNA was electro-transferred to nylon membranes (Genescreen Plus, Life Science Products, Boston, MA) using a Trans Blot SD (Bio-Rad), according to Mulyzer *et al.* (1998). A 930 bp fragment of the Tn501-*merA* gene covering the sequence encoding the active site of the mercuric reductase enzyme was amplified using primers merA1GN and merdA2. PCR products were labelled with [γ -³²P]-dCTP by random priming as recommended by the supplier (Kit Random Primed Boehringer, Mannheim, Germany). Hybridization was carried out at 65°C (in Denhardt 5X, SSPE 5X, SDS 0.1% w/v) and washes at 65°C (in SSC 1X). Hybridization signals were detected and analyzed with the Bio-Rad GS-525 Molecular Imager and the Molecular Analyst software (Bio-Rad).

Restriction profiles and sequencing

Amplified fragments of *merA* gene were digested to obtain restriction profiles using two enzymes: *AluI* (Fermentas) and *MaeIII* (Roche). A 10 µl reaction mixture was composed of: 1 U of restriction enzyme, 0.4X of buffer: Tango (Fermentas) or *MaeIII* incubation buffer (Roche) for *AluI* and *MaeIII* respectively, 5 to 10 µl of PCR product. Incubation was done during 2 hours, at 37°C for *AluI* and 55°C for *MaeIII*. Restriction fragments were visualised in a 3 % low melting agarose (Metaphor[®], Tebu-Bio) gel electrophoresis. Amplification product of one of each profile was sequenced (Cogenics, France).

Phylogenetic analysis

Sequences obtained from our study and sequences of *merA* genes from various species obtained in NCBI were used to establish a *merA* phylogeny. Alignment of sequences and phylogenetic tree were done using Seaview 4.2 software (pbil, Lyon, France). The pair-wise evolutionary distances were calculated using Kimura2-parameter model. The phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining (bioNJ) method with 500 replicates using bootstrap.

RESULTS

***merA* gene restriction profiles and genomic localization**

In a previous study we detected *merA* gene among 42 over 127 strains (33%) of *P. aeruginosa* from hospital and environmental origin (data summarized in Table 13). A comparable prevalence: 27%, was observed among a collection of 67 *S. maltophilia* strains. Whatever the species, strains originating from the hospital had a higher frequency of *merA* gene (61 and 46% for *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, respectively) than strains from the environment (12 and 13% for *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, respectively). No relationships between *merA* detection and mercury resistance were observed since most of the *merA*-carrying isolates had a sensitive phenotype [no growth in the presence of 10 µM of Hg(II)]. Detailed results of the prevalence of mercury resistance phenotype and *merA* carriage among strains of various origins are provided in Table 13. The diversity of the genes was further analyzed by enzymatic restriction. Eleven profiles named A to J were obtained (Table 14). Nine profiles were observed among *P. aeruginosa* strains and 3 among *S. maltophilia* strains. The profiles A and D were common to both species and the A profile was found dominant in each species representing 44% and 60% of the *merA* gene pool among *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, respectively.

Table 13. Abundance (in percent) of the mercury resistance phenotype among *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* strains.

	hospital environment	hospital patients	CF patients	healthy captive snakes	lagoon	soil related samples
<i>P. aeruginosa</i>						
mercury resistant	5/16 (31%)	6/13 (46%)	1/25 (4%)	0/13 (0%)	0/14 (0%)	8/46 (17%)
containing <i>merA</i>	16/16 (100%)	10/13 (78%)	7/25 (28%)	3/13 (23%)	4/14 (29%)	2/46 (4%)
	hospital patients	CF patients	soil from Burkina	soil from Tunisia	soil from France	
<i>S. maltophilia</i>						
mercury resistant	1/16 (6%)	1/12 (8%)	0/8 (0%)	4/18 (22%)	0/27 (0%)	
containing <i>merA</i>	9/16 (56%)	4/12 (33%)	0/8 (0%)	4/18 (22%)	1/27 (4%)	

Table 14. Abundance (in percent) of the *merA*-like gene among *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* strains and distribution of the various profiles depending on strain origin.

Profiles present among <i>P. aeruginosa</i> strains	hospital environment (16)	hospital patients (10)	CF patients (7)	healthy captive snakes (3)	lagoon (4)	soil related (3)	Frequency of the profile (%)
A profile	8	5	1	3	2	0	19/43 (44)
B profile	4	2	0	0	0	0	6 (14)
C profile	1	0	3	0	2	0	6 (14)
D profile	3	1	0	0	0	2	6 (14)
E profile	0	0	1	0	0	0	1 (2)
F profile	0	0	1	0	0	0	1 (2)
G profile	0	0	1	0	0	0	1 (2)
H profile	0	1	0	0	0	1	2 (4)
I profile	0	1	0	0	0	0	1 (2)
Profiles present among <i>S. maltophilia</i> strains	hospital patients (9)	CF patients (4)	soil from Tunisia (4)	soil from France (1)	Frequency of the profile (%)		
A profile	5	3	3	0	11/18 (60)		
D profile	4	1	1	0	6 (34)		
J profile	0	0	0	1	1 (6)		

The determinants observed among *P. aeruginosa* were all found among the hospital strains (Table 14) whereas only 4 profiles, A, C, D and H, were found among environmental strains. Differences were also seen between the hospital strains and the CF strains both considering the prevalence which was lower among CF strains and the diversity. The profiles A, B, C, D, H and I were found within the former group and the profiles E, F, and G within the latter group. Of the 18 *S. maltophilia* carrying *merA* gene, profiles A, D and J were obtained. Profiles A and D were common to hospital and environmental strains.

Hybridization with a *merA* probe of plasmid profiles from 35 *P. aeruginosa* strains and 16 *S. maltophilia* strains evidenced that except *P. aeruginosa* ATCC15691, *merA* genes were always located in the chromosome.

***merA* gene sequence and phylogeny**

From 1 to 7 *merA* PCR products *per* restriction profile were sequenced. BLAST analysis showed that the sequences from profile A presented a 100% homology with the *merA* gene present on the Tn501 (Table 15). Sequences from profile B showed 89 % with the TN501, those from profile C 100% homology with the one present on the PAGI-5 genomic island and sequences from profile D showed 100% homology with the *merA* gene present on the PAGI-2 genomic island or the *merA* gene of a genomic island of *P. aeruginosa* LESB58 related to PAGI-2. Sequences from the remaining profiles showed 100% homology with Tn21 (profile E), 89% homology with Tn21 (profile F), 99% homology with Tn5041 (profile G), 100% homology with Tn512 (profile H), and 95% homology with Tn1696 (profile I). None of the profiles detected among *S. maltophilia* strains presented sequence homology with the *merA* gene present in the genome of the clinical strain K279a. The J profile presented only a maximal homology score of 80 % with PAGI-2.

BLAST analysis of the *mer* sequences found on the sequenced genomes of *P. aeruginosa* showed that the *mer* operon of PA14 is homologous to the one present on the Tn501 and the one present in LESB58 is homologous to the one present on the PAGI-2 genomic island (Table 15). Strain PA7 possessed two complete *mer* operons homologous to the operons present on PAGI-5 genomic island and on the Tn501 and a partial *mer* operon (without *merA*) homologous to the one present in *P. stutzeri* A1501. BLAST analysis of the *mer* sequence found in the genome of the K279a *S. maltophilia* strain presents a 82 % homology to the one present on *P. aeruginosa* LESB58 genome. The *P. aeruginosa* strain PAO1 and the *S. maltophilia* strain R551-3 possess any *mer* operon.

Table 15. Homology between the *merA*-like sequences detected among *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* strains and the *merA* sequences available in GenBank.

Species	Strain name	<i>merA</i> profile	Closest relative (sequence homology %)
<i>S. maltophilia</i>			
	V4	J	LESB58, PAGI2 (80)
	I3	D	LESB58, PAGI-2 (100)
	I2	A	Tn501 (100)
	I11	A	Tn501 (100)
<i>P. aeruginosa</i>			
	bpoe 639	A	Tn501 (100)
	bpoe 692	A	Tn501 (100)
	poe 1081	A	Tn501 (100)
	poe 22	A	Tn501 (100)
	ATCC 15691	A	Tn501 (100)
	poe 131	B	Tn501 (89)
	poe 19	B	Tn501 (89)
	poe 1312	C	PAGI-5, PA7 (100)
	poe 1045	C	PAGI-5, PA7 (100)
	poe 103	C	PAGI-5, PA7 (100)
	833	C	PAGI-5, PA7 (100)
	ATCC 31479	D	LESB58, PAGI-2 (100)
	DB3046	E	Tn21 (91)
	373	F	Tn21 (100)
	186	G	Tn5041 (99)
	ATCC 27853	H	Tn512 (100)
	LMG 9009	H	Tn512 (100)
	PA6	I	Tn1696 (95)

Table 16. Screening of the PAGI-2 sequences among the *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* strains carrying *merA*-like sequence.

Species	Origin	Name	Restriction profile	PAGI-2 sequences				
				C22	C81	C98	C105	C108
<i>P. aeruginosa</i>								
Hospital	Environment	poe9	D	-	+	+	+	+
		poe73	D	-	+	+	+	+
		poe73	D	-	+	+	+	+
		poe81	D	-	+	+	+	+
	ATCC31379	D	+	+	+	+	+	
	DSMZ6195	D	-	+	+	+	+	
<i>S. maltophilia</i>								
Hospital	Environment	I7	D	-	+	+	+	+
		I3	D	-	+	+	+	+
		I6	D	-	+	+	+	+
		CF4	D	-	+	+	+	+
	N7	D	+	+	+	+	+	

Detection of PGI-2 sequences

Amplification with the 5 pairs of primers designed for the detection of C22, C81, C98, C105 and C108 sequences gave positive results at least with C81, C98, C105 and C108 sequences for 5 out of the 6 *S. maltophilia* strains with a D profile/PGI-2 like *merA* sequence and the 6 *P. aeruginosa* with a D profile (Table 16).

Relationship between *merA* profiles and resistance to antibiotics

No clear relationship was observed between the *merA* profiles and the antibiotic resistance patterns except for the *P. aeruginosa* strains that had the B profile. These strains were all found resistance to imipenem. A partial relationship was observed for the hospital strain showing a PGI-2 like profile (Profile D) since they showed a resistant or intermediate resistance to amikacyn, gentamicin and isepamicin. As observed for the strains showing the B profile and resistance to imipenem these D profile strains were all isolated from the same hospital. The D profile strains from the environment were sensitive to these antibiotics.

None of the *S. maltophilia* strain showed any relationships between antibiotic patterns and *merA* profiles.

DISCUSSION

Our previous work (data summarized in Table 13) evidenced the higher prevalence of mercury resistant phenotype and *merA*-like gene among strains originating either from hospital (environment and patients) than among environmental strains. We attributed this observation to a higher selective pressure due to the past mercury use and/or to the presence of antimicrobial agents that select both heavy metal resistance and antibiotic resistance. Association between antibiotic and mercury resistance genes on mobile elements as plasmids or transposons has been frequently described in both strains from the environment and the hospital. Genes encoding β -lactamases (*bla*_{VIM}), enabling resistance to β -lactams, aminoglycoside modifying enzyme (*aad*), tetracycline resistance (*tetA*, *tetR*) or sulphonamide resistance (*sul*) have already been found associated to *mer* operon (Vezina & Levesque, 1991, Schluter, *et al.*, 2003, Li, *et al.*, 2008). We then investigated a potential association between *merA* determinants and antibiotic resistance that could explain maintenance of *merA* gene despite absence of mercury resistance phenotype. We first investigated *merA* diversity in

order to determine if some determinants were dominant among hospital or environmental strains and if the same determinants were present in both ecosystems. The highest diversity was found among *P. aeruginosa* hospital strains, with all determinants found in *P. aeruginosa* (9) represented among them. Only 4 out of the 9 determinants were found among environmental strains of *P. aeruginosa* (Table 14 and 15).

Two out of the 3 determinants found among *S. maltophilia* strains were common to the *P. aeruginosa* ones i.e. profiles A and D. Interestingly we observed that strains possessing one particular *merA* determinant, i.e. D profile, were able to grow in presence of mercury when they originated from the environment and did not when they originated from the hospital, in both models. This observation suggested that resistance co-selection could favour the maintenance of the *merA* gene in the hospital. We then searched for links between *merA* determinants and antibiotic resistance profiles in order to evaluate the presence of dominant associations. No particular association was observed in environmental strains for both models. It was rather surprising since environmental mercury resistant bacterium frequently presented resistance to other compounds as antibiotics (Rasmussen & Sorensen, 1998, Ball, *et al.*, 2007). However, these bacteria are usually isolated from mercury contaminated sites unlike environmental *P. aeruginosa* strains of our study. Concerning strains from the hospital, particular associations were observed only among *P. aeruginosa* strains. Two different associations were found and all the strains implicated originated from the same hospital (Lavenir, *et al.*, 2008). However, these strains had different origins within the hospital (aeration grids, water system, rectal swabs). Moreover, these strains belonged to different clonal complexes as defined by pulse field gel electrophoresis. The first association was observed in all the strains that had a *merA* B profile (89 % homologous to *merA* of the Tn501). This profile was only found among hospital strains that were characterized by their resistance to imipenem. Imipenem resistance in *P. aeruginosa* could be acquired by the inactivation of the OprD porine or by acquisition of β -lactamases. Such enzymes have already been found on mobile elements (plasmid and transposon) with part or complete Tn501 (Vezina & Levesque, 1991, Li, *et al.*, 2008). Huang *et al.* also reported that the Tn501 could insert in a sequence supposed to regulate *oprD* expression leading to imipenem resistance in *P. aeruginosa* (Huang, *et al.*, 1992). The second example of association between antibiotic resistance phenotype and *merA* profile association was observed among the 4 hospital strains showing a *merA* D profile (which present a 100 % homology with the one present on the PGI-2 genomic island). However, this phenotype was not recovered from environmental strains which presented a D profile. These 4 clinical strains were resistant (R)/intermediate (I)

to ticarcillin and ticarcilline + clavulanic acid (β -lactams), I/sensitive (S) to cefepim and aztreonam β -lactams) and R/I to amikacin, gentamicin and isepamicin (aminoglycosides). To confirm the presence of PAGI-2 like genomic island in these strains, presence of specific genes was investigated by PCR with specific primers previously defined by Klockgether *et al.* (2008) and Finnan *et al.* (2004), allowing the amplification of the C22, C81, C98, C105, C108 genes. In the 4 strains, C22 was absent and C81, C98, C105, C108 were present (Table 16). The absence of one gene was not surprising since PAGI-2 genomic island is composed of cargo genes which could be present or absent in *P. aeruginosa* strains leading to a high diversity of PAGI-2 like genomic island (Klockgether, *et al.*, 2007). A high diversity of PAGI-2 like genomic islands, corresponding to PAGI-2 genomic islands which have lost one or more gene cargos, is observed among both clinical and environmental *P. aeruginosa* strains (Klockgether, *et al.*, 2007). We could hypothesize that strains from the Hospices Civils de Lyon has acquired a PAGI-2 like genomic island which has received antibiotic resistance determinants. These strains did not present a mercury resistance phenotype, suggesting that the maintenance of mercury resistance genetic determinants could be associated to the maintenance of the total mobile element which could potentially contain antibiotic resistance genes. High antibiotic pressure in the hospital could select this element composed of both antibiotic and mercury resistance determinants. However, PAGI-2 like genomic islands are known to encode mercury resistance mechanism, heavy metal ions transport and metabolic functions but not antibiotic resistance mechanisms (Larbig, *et al.*, 2002) and we were not able to confirm the association of antibiotic and mercury resistance genes on the same mobile element; so we could not refute the hypothesis of two distinct acquisitions of resistance mechanisms. As a bacteriophage P4-type integrase is present on PAGI-2, research of integron encoding antibiotic resistance in the 4 clinical strains could be investigated in order to identify the genotype responsible of the particular antibiotic resistance phenotype.

PAGI-2 has been partially found in other gamma-proteobacteria (*clc* element of *Pseudomonas putida*) and completely in the *Cupriavidus metallidurans* CH34 β -proteobacteria, suggesting that it can be mobilized from the chromosome to insert in the chromosome of other strains/species (Gaillard, *et al.*, 2006, Van Houdt, *et al.*, 2009). In order to evaluate the presence of a PAGI-2-like genomic island in *S. maltophilia* strains possessing a *merA* determinant belonging to the D profile (i.e. *merA* gene homologous to the one present on PAGI-2), presence of the C22, C81, C98, C105, C108 genes was investigated. Among the 4 clinical strains with a *merA* determinant belonging to the B profile, 3 possessed 4 of the 5 PAGI-2 specific genes (C22 was absent) and the last one possessed none of these genes

(Table 16). The environmental strain possessing a *merA* determinant belonging to the D profile presented the 5 PGI-2 specific genes. The environmental strain possessing a *merA* determinant belonging to the C profile (homologous with *merA* present on PGI-2 at 82 %) was also tested and none of the genes were present. Different studies revealed the capacity of *S. maltophilia* clinical strains to acquire mobile elements (Avison, *et al.*, 2000, Chang, *et al.*, 2004, Toleman, *et al.*, 2007). Especially, the clinical strain D457R possessed a cluster of gene potentially allowing macrolide and cadmium resistance which present a high homology with a sequence present in Gram positive bacteria (Alonso, *et al.*, 2000). To our knowledge, this is the first demonstration of a putative acquisition of a mobile element in both clinical and environmental strains of *S. maltophilia*. Our results suggested that PGI-2 like genomic island could have been acquired in both clinical and environmental strains of *S. maltophilia*, involving that these two species shared the same habitat. *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* can be found simultaneously in the same ecological niche. In the hospital, they are both major nosocomial pathogens and can be both isolated from CF lungs. In the environment, such exchanges seem to be less frequent. Despite their ubiquity in a large panel of environments, few studies investigated and showed their presence simultaneously. In a previous work, we failed to highlight the presence of these two species simultaneously in soils, whatever their origin (France, Tunisia, Burkina Faso) (Deredjian *et al.*, submitted).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a CORUS project of the French “Ministère des Affaires étrangères” and a EC2CO project supported by the INSU and INEE departments of CNRS. A. Deredjian was funded by a grant from the CNRS. We thank participants of the CORUS and EC2CO projects for soil sampling.

REFERENCES

Alonso A, Sanchez P & Martinez JL (2000). *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1778-1782.

- Avison MB, von Heldreich CJ, Higgins CS, Bennett PM & Walsh TR (2000).** A TEM-2beta-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 46: 879-884.
- Ball MM, Carrero P, Castro D & Yarzabal LA (2007).** Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolivar State, Venezuela). *Curr Microbiol* 54: 149-154.
- Battle SE, Rello J & Hauser AR (2009).** Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 290: 70-78.
- Berg G, Eberl L & Hartmann A (2005).** The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* 7: 1673-1685.
- Binks PR, Nicklin S & Bruce NC (1995).** Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl Environ Microbiol* 61: 1318-1322.
- Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM & Wu WJ (2004).** Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 53: 518-521.
- Crossman LC, Gould VC, Dow JM, et al. (2008).** The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9: R74.
- Denton M, Todd NJ, Kerr KG, Hawkey PM & Littlewood JM (1998).** Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *J Clin Microbiol* 36: 1953-1958.
- Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F & Boyd EF (2004).** Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *J Clin Microbiol* 42: 5783-5792.
- Gaillard M, Vallaeyts T, Vorholter FJ, et al. (2006).** The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. *J Bacteriol* 188: 1999-2013.
- He J, Baldini RL, Deziel E, et al. (2004).** The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2530-2535.
- Hickey WJ & Focht DD (1990).** Degradation of mono-, di-, and trihalogenated benzoic acids by *Pseudomonas aeruginosa* JB2. *Appl Environ Microbiol* 56: 3842-3850.

- Huang H, Siehnel RJ, Bellido F, Rawling E & Hancock RE (1992).** Analysis of two gene regions involved in the expression of the imipenem-specific, outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 76: 267-273.
- Juhnke ME & des Jardin E (1989).** Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Appl Environ Microbiol* 55: 747-750.
- Kaszab E, Kriszt B, Atzel B, Szabo G, Szabo I, Harkai P & Szoboszlay S (2009).** The Occurrence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* on Hydrocarbon-Contaminated Sites. *Microb Ecol*.
- Klockgether J, Wurdemann D, Wiehlmann L & Tummler B (2008).** Transcript profiling of the *Pseudomonas aeruginosa* genomic islands PAGI-2 and pKLC102. *Microbiology* 154: 1599-1604.
- Klockgether J, Wurdemann D, Reva O, Wiehlmann L & Tummler B (2007).** Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 2443-2459.
- Larbig KD, Christmann A, Johann A, et al. (2002).** Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. *J Bacteriol* 184: 6665-6680.
- Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, et al. (2008).** Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *J Appl Microbiol* 105: 1491-1501.
- Li H, Toleman MA, Bennett PM, Jones RN & Walsh TR (2008).** Complete Sequence of p07-406, a 24,179-base-pair plasmid harboring the blaVIM-7 metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3099-3105.
- Liebert CA, Hall RM & Summers AO (1999).** Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 507-522.
- Matyar F, Kaya A & Dincer S (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci Total Environ* 407: 279-285.
- Mesáros N, Nordmann P, Plesiat P, et al. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 13: 560-578.
- Mindlin S, Kholodii G, Gorlenko Z, et al. (2001).** Mercury resistance transposons of gram-negative environmental bacteria and their classification. *Res Microbiol* 152: 811-822.

Morales G, Wiehlmann L, Gudowius P, van Delden C, Tummler B, Martinez JL & Rojo F (2004). Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping. *J Bacteriol* 186: 4228-4237.

Moulton PJ, Vivian A, Hunter PJ & Taylor JD (1993). Changes in cultivar-specificity toward pea can result from transfer of plasmid RP4 and other incompatibility group P1 replicons to *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*. *J Gen Microbiol* 139: 3149-3155.

Nascimento AM & Chartone-Souza E (2003). Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res* 2: 92-101.

Nicodemo AC & Paez JI (2007). Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 229-237.

Pellett S, Bigley DV & Grimes DJ (1983). Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 45: 328-332.

Rasmussen LD & Sorensen SJ (1998). The effect of longterm exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. *Curr Microbiol* 36: 291-297.

Ready D, Pratten J, Mordan N, Watts E & Wilson M (2007). The effect of amalgam exposure on mercury- and antibiotic-resistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 30: 34-39.

Schluter A, Heuer H, Szczepanowski R, Forney LJ, Thomas CM, Puhler A & Top EM (2003). The 64 508 bp IncP-1beta antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1beta group. *Microbiology* 149: 3139-3153.

Summers AO, Wireman J, Vimy MJ, et al. (1993). Mercury released from dental "silver" fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 825-834.

Taghavi S, Garafola C, Monchy S, et al. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75: 748-757.

Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN & Walsh TR (2007). Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. *Emerg Infect Dis* 13: 559-565.

Van Houdt R, Monchy S, Leys N & Mergeay M (2009). New mobile genetic elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34, their possible roles and occurrence in other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96: 205-226.

Vezina G & Levesque RC (1991). Molecular characterization of the class II multiresistance transposable element Tn1403 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 313-321.

Wireman J, Liebert CA, Smith T & Summers AO (1997). Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates. *Appl Environ Microbiol* 63: 4494-4503.

Conclusions

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons mis en évidence une grande diversité intra-spécifique des déterminants *merA*. En effet, 9 déterminants différents ont été obtenus au sein de la collection de souches de *P. aeruginosa* et 3 au sein de la collection de souches de *S. maltophilia*. Parmi les 9 déterminants présents chez les souches de *P. aeruginosa*, tous sont représentés parmi les souches hospitalières alors que seulement 4 sont présents chez les souches d'origine environnementale, suggérant une diversité plus grande dans l'environnement hospitalier. En ce qui concerne *S. maltophilia*, 2 des déterminants sont présents à la fois chez des souches d'origine clinique et environnementale. Le 3^{ème} déterminant n'est représenté que par une souche d'origine environnementale.

Nous avons également observé la présence de 2 déterminants communs chez les deux modèles. Le premier est homologue à celui présent sur le transposon Tn501, largement distribué dans les communautés bactériennes. Le deuxième présente une homologie avec celui porté par l'îlot génomique PAGI-2 (*Pseudomonas aeruginosa* Genomic Island-2), répandu chez *P. aeruginosa*. La présence d'îlots de type PAGI-2 a été confirmée par PCR avec des amorces spécifiques chez des souches d'origine clinique et environnementale de *S. maltophilia*, suggérant un échange entre les deux modèles. Cet échange n'est possible qu'à la condition que les souches partagent la même niche écologique, comme ce peut être le cas dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose. En revanche, la recherche simultanée des 2 modèles dans des échantillons environnementaux est rare et nous avons pu constater lorsque nous avons recherché les 2 espèces dans les mêmes échantillons de sols que seule *S. maltophilia* était détectable. De ce fait, il est plus difficile d'envisager un échange génétique entre ces 2 espèces dans l'environnement, en particulier dans les sols.

Enfin, une association entre la présence d'un déterminant *merA* homologue à celui présent sur PAGI-2 et un profil particulier de résistance aux antibiotiques a été mise en évidence chez les souches d'origine hospitalière de *P. aeruginosa*. Nous avons pu confirmer la présence d'un îlot génomique de type PAGI-2. Toutefois, cet îlot n'est pas connu dans la littérature pour être responsable de résistance aux antibiotiques (Larbig, *et al.*, 2002, Klockgether, *et al.*, 2007) et l'hypothèse de co-résistance reste à confirmer.

Nous sommes bien conscient que les travaux présentés dans cette section ne sont pas suffisants à démontrer des phénomènes de co-résistance mercure / antibiotiques, ni même les échanges d'éléments génétiques mobiles entre les deux modèles. De plus la méthodologie

utilisée ne permet pas d'écarter de façon définitive l'absence de co-résistance, en particulier chez les souches de *S. maltophilia* qui présentent fréquemment des résistances aux antibiotiques. Cependant, les résultats obtenus ont permis d'identifier certaines pistes qui nécessiteront des travaux ultérieurs tels que la recherche des déterminants génétiques à l'origine des phénotypes de résistance aux antibiotiques particuliers retrouvés chez les souches hospitalières de *P. aeruginosa* ainsi que la mise en évidence de lien avec l'ilot génomique et les déterminants codant pour la résistance au mercure.

Conclusions (English version)

In the second part of this chapter, we highlighted a high intra-specific diversity of *merA* determinants. Nine different determinants were obtained among *P. aeruginosa* strains and 3 among *S. maltophilia* strains. Among the 9 determinants present in *P. aeruginosa* strains, all were represented among hospital strains since only 4 were also present in environmental strains, suggesting a higher diversity in the hospital environment. Concerning *S. maltophilia*, 2 determinants were present in both hospital and environmental strains. The third determinant was only present in one environmental strain.

We also observed two common determinants among strains of the two models. The first one was homologous to the one present on the Tn501, widely distributed in microbial communities. The second one presented homology to the determinant present on the PAGI-2 genomic island, widespread in *P. aeruginosa* strains. Presence of PAGI-2 like genomic island was confirmed by PCR with specific primers in both environmental and hospital strains of *S. maltophilia*, suggesting an exchange between the two species. This exchange is only possible if strains share the same ecological niche as it can be the case in the lungs of CF patients. However, the simultaneous search of the two models in environmental samples is rare and we observed when we looked for both species in the same soil samples that only *S. maltophilia* was present. Thus, it is more difficult to consider a genetic exchange between these two species in the environment, especially in soils.

Finally, one association between a *merA* determinant homologous to the one present on PAGI-2 and a particular antibiotic resistance profile was highlighted in hospital strains of *P. aeruginosa*. We confirmed the presence of a PAGI-2 like genomic island (Larbig, *et al.*, 2002, Klockgether, *et al.*, 2007). However, this island is not known as responsible to antibiotic resistance and the hypothesis of co-resistance remains to be confirmed.

We are aware that the results presented in this section are not sufficient to demonstrate antibiotic and mercury co-resistance phenomena as well as genetic exchange between the two models. Moreover, the methodology used here does not enable to confirm the absence of co-resistance especially in *S. maltophilia* strains that present high antibiotic resistance capacity. However, these results enable to identify tracks that will require further works such as the research on genetic determinants implicated in the particular antibiotic resistance phenotypes observed in *P. aeruginosa* hospital strains as well as their links with genomic island and mercury resistance determinants.

**Chapitre 3 : Effet des contaminations métalliques et organiques sur la
sélection et le maintien de résistances dans la communauté microbienne
indigène du site de Pierrelaye**

**Chapter 3: Effect of metallic and organic contaminations on the selection
and maintenance of resistances in the indigenous microbial community of
the site of Pierrelaye**

Introduction

Dans la première partie du chapitre précédant, nous avons constaté que les populations de *S. maltophilia* présentes dans les sols français présentaient peu de résistance aux antibiotiques et aux métaux et cela malgré la présence de pression sélective telles que de fortes concentrations en métaux dans le site de Pierrelaye. Ainsi, la pression métallique ne favoriserait pas l'émergence de résistance aux antibiotiques chez cette espèce. On peut alors se demander si cette observation est une particularité de cette espèce ou bien si c'est le fait d'une faible disponibilité des métaux qui se retrouvent piégés dans la matière organique également présente en grande quantité dans les sols de ce site. Pour répondre à ces interrogations, nous avons choisi de nous intéresser à la résistance aux métaux et aux antibiotiques de façon plus globale en étudiant l'ensemble de la communauté bactérienne indigène du site de Pierrelaye. Cette étude a eu pour objectifs i) d'évaluer l'effet de contaminations anthropiques sur la sélection et le maintien des résistances aux antibiotiques et aux métaux au sein de la communauté bactérienne, ii) d'identifier les espèces présentant des capacités de résistance importantes iii) et enfin de rechercher la présence de déterminants génétiques impliqués dans la résistance aux antibiotiques largement répandus dans le milieu hospitalier. Pour cela, nous avons évalué la proportion de la microflore hétérotrophe totale résistante d'une part à des antibiotiques utilisés de façon courante dans le milieu hospitalier : la gentamicine appartenant à la famille des aminoglycosides, l'imipénème appartenant à la famille des β -lactamines et la ciprofloxacine appartenant à la famille des quinolones ; et d'autre part résistante aux métaux : zinc, cadmium et mercure. Les isolats représentant les différents morphotypes présents dans les communautés résistantes ont été identifiés après séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S par recherche d'homologie avec l'outil informatique GenBank BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). La présence de gènes de résistance aux antibiotiques portés par des éléments génétiques mobiles tels que *ant(2'')*-I (ou *aadB*) et *aac(6')*-II/Ib (ou *aacA4*) à l'origine de la résistance aux aminoglycosides et *bla_{IMP}* et *bla_{VIM}* à l'origine de la résistance aux carbapénèmes (β -lactamines), fréquemment identifiés dans des isolats cliniques a été recherchée par PCR au sein des isolats résistants ainsi que dans l'ADN total extrait des sols. De même, les gènes responsables de la résistance au mercure étant également souvent positionnés sur des éléments génétiques mobiles, nous avons recherché la présence du gène *merA*, codant pour la mercurique réductase, avec des amorces spécifiques des bactéries à Gram négatif, chez les isolats Gram négatif ainsi que dans l'ADN total extrait des sols.

Introduction (English version)

In the first part of the previous chapter, we observed that *S. maltophilia* strains isolated from French sites showed little antibiotic and heavy metal resistance despite the presence of selective pressure as high heavy metal concentration in the site of Pierrelaye. Heavy metal pressure would not favour the emergence of antibiotic resistance in this species. We can wonder if it is a particularity of this species or if it is due to a low availability of the heavy metals that could be linked to exogenous organic matter, present in high quantity in this site. To answer these questions, we focused on heavy metal and antibiotic resistance capacities in the indigenous community of the site of Pierrelaye.

This study aimed at i) evaluating the impact of anthropogenic contaminations on the selection and maintenance of heavy metal and antibiotic resistance in the microbial community, ii) identifying species that present elevated resistance capacities and finally iii) evaluating the prevalence in the community of genetic determinants implicated in antibiotic resistance widespread in the hospital. To do that, we evaluated the proportion of the total heterotrophic microflora resistant to antibiotics routinely used in hospitals, i) gentamicin belonging to the aminoglycoside family, ii) imipenem belonging to the β -lactam family and iii) ciprofloxacin belonging to the quinolone family. We also looked at the proportion of the total heterotrophic microflora resistant to the heavy metals zinc, cadmium and mercury. Isolates representative of the different morphotypes present in the resistant communities were identified by sequencing the 16S rRNA encoding gene and further search for homology with GenBank BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The presence of antibiotic resistance genes carried by mobile genetic elements as *ant(2'')*-I (or *aadB*) and *aac(6')*-II/Ib (or *aacA4*) implicated in aminoglycoside resistance and *bla_{IMP}* and *bla_{VIM}* implicated in carbapenem (β -lactams) resistance and frequently found in clinical isolates was investigated by PCR in the resistant isolates as well as in the total soil DNA. Similarly, *merA* gene, encoding the mercuric reductase was also looked for, as mercury resistance genes are often present on mobile elements, using primers specific of Gram negative bacteria in Gram negative isolates and in soil DNA.

“Detection of bacterial opportunistic pathogens among the antibiotic and heavy metal resistant isolates from a chronically heavy metal contaminated soil”

Amélie Deredjian*, Céline Colinon, Elisabeth Brothier, Sabine Favre-Bonté, and Sylvie Nazaret

Université de Lyon, France; Research Group on « Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment », CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, and Université Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne, France.

Short running title: Antibiotic and heavy metal resistance in soil bacterial communities

Key-words: antibiotic and heavy metal resistance, heavy metal contamination, bacterial communities, soil, opportunistic pathogens

*Corresponding author. Mailing address: Université de Lyon, France; Research Group on « Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment », CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, and Université Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne, France.

ABSTRACT

Toxic compound contaminations due to anthropogenic activities are suspected to play a role in the selection, the maintenance and the spread of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genetic determinants in the environment. Here we aimed at evaluating the role of heavy metal contamination on the selection of antibiotic resistant populations in soils from the Pierrelaye Bessancourt Plain (Val d'Oise, France) which had been irrigated with the non-treated wastewater from Paris during a century. Even if the highest antibiotic resistant bacteria effectiveness were found in highly contaminated sites, we failed to find an association between heavy metal contamination and antibiotic resistant bacteria prevalence. Low heavy metal resistance capacity of the total heterotrophic microflora suggested that the heavy metals were non available for the bacterial community, probably due to the presence of high concentration of organic matter that links to heavy metals. Identification of imipenem, gentamicin and ciprofloxacin resistant bacteria showed a low diversity in the antibiotic resistant community and the belonging of these bacteria to genera and species that are qualified as opportunistic pathogens frequently implicated in nosocomial infections as *S. maltophilia*, *Bacillus* spp. or *Streptomyces* spp. Moreover, research of antibiotic resistance genes essentially found in clinical isolates showed the presence in a highly contaminated soil of a *bla*_{IMP} variant, implicated in carbapenem resistance, suggesting that environmental conditions present in this soil could maintain this gene. The results presented here suggested that opportunistic pathogens are widespread in the environment and contaminations due to anthropogenic activities could lead to their spread. Moreover, presence of antibiotic resistance determinants could favor the emergence of multi-resistant isolates of public health concern.

INTRODUCTION

Since their discovery, antibiotics have been used to limit bacterial infections and have been considered as the most effective therapy used by Human beings. However, the last decades have seen the emergence and dispersion of resistant bacteria increasing, leading to difficulties to find effective treatments (Wright, 2007). The mechanisms and genetic determinants implicated in these resistances are the subject of numerous studies (Levy & Marshall, 2004, Walsh, 2005) and it is now accepted that excessive and inadequate antibiotic use in hospital has played the role of pressure favoring the selection, the maintenance and the dispersion of antibiotic resistant isolates (Slama, 2008). However, efforts to reduce antibiotic use have only a slight effect in the limitation of resistance expansion (Cook, *et al.*, 2004). This observation leads to an increasing interest in antibiotic resistance in the environment and the putative selective pressures involved in antibiotic resistance emergence and maintenance. Antibiotic resistance has been found in a variety of environments from soil (Riesenfeld, *et al.*, 2004) to water and sediments (Kummerer, 2009). Especially, soil is considered as a reservoir of determinants which can potentially be mobilized into the microbial community and the resistome corresponding to all the genetic determinants implicated in antibiotic resistance in soils, has recently been described (D'Costa, *et al.*, 2006). Moreover, bacteria known as environmental isolates are increasingly found being responsible for nosocomial infection and join the already long list of opportunistic pathogens (Martinez & Baquero, 2002). The success of the adaptation of these bacteria in the hospital environment could be partly related to their antibiotic resistance capacities (McGowan, 2006).

The presence of antibiotic resistance in the environment, especially in pristine environments, could be explained by the presence of antibiotics due to the presence of antibiotic producers in the microbial community. These producers also have the capacity to resist to the produced molecules and such mechanisms could be acquired and selected by other bacteria of the community to compete with the producers. Antibiotic contamination due to anthropogenic activities as well as the presence of bacterial toxicants may participate to the selection of resistance (Martinez, 2009). For instance several studies highlighted that microbial communities were more resistant to antibiotics in environments contaminated with heavy metals or organic compounds (Filali, *et al.*, 2000, Matyar, *et al.*, 2008, Kaszab, *et al.*, 2009). In presence of heavy metals, antibiotic resistance may be co-selected with heavy metal resistance in three ways (Baker-Austin, *et al.*, 2006): i) co-resistance occurred when resistance determinants are present on the same mobile element as plasmid or transposon, ii) cross

resistance occurred when the same mechanism enables both resistance and iii) co-regulation occurred when the same regulation system is involved in the regulation of both resistance mechanisms. Since contaminated environments can be enriched in antibiotic resistance determinants and since opportunistic bacterial pathogens are widespread in the environment and performed well in the colonisation of the hospital due to their resistance to antibiotics, these species are good candidates for the acquisition and dissemination of antibiotic resistance from contaminated environments.

In previous works we demonstrated the extensive distribution of the opportunistic bacterial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* (Deredjian *et al.*, submitted) in soils from various geographical origins and exposed to various anthropogenic constraints. Surprisingly, isolates from a highly heavy metal contaminated soil showed low antibiotic and heavy metal resistance capacities in comparison with clinical strains or environmental strains from uncontaminated sites in Tunisia and Burkina Faso. To explain these observations we hypothesized that heavy metals were unavailable to the indigenous bacteria due to intrinsic soil characteristics (i.e., high content of organic matter that traps heavy metals, leading to the lack of pressure for the selection of heavy metal and/or antibiotic resistance). Then in the absence of selective pressure resistance to heavy metals and/or antibiotic, was not stimulated within the whole bacterial community. To address that point we undertook a study on the indigenous soil bacterial communities of this site (Pierrelaye Bessancourt Plain, Val d'Oise, France), an agricultural plain which had been irrigated with the non-treated wastewater of Paris during a century). We evaluated the prevalence of heavy metal resistant bacteria as well as the prevalence of bacteria resistant to different wide spectrum antibiotics frequently used to treat clinical infections i.e. gentamicin (aminoglycoside), imipenem (β -lactam), ciprofloxacin (quinolone). The site of Pierrelaye is contaminated with several heavy metals including mercury, cadmium, zinc, and lead. We focussed our attention on mercury resistance since mercury resistance determinants are frequently present on mobile genetic element, potentially associated with antibiotic resistance determinants (Liebert, *et al.*, 1999), as well as on cadmium and zinc resistance since genetic determinants as the *czc* operon encoded efflux pump has been shown to co-regulate heavy metal and antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (Perron *et al.*, 2004).

MATERIAL AND METHODS

Study site and sample collection

The Pierrelaye study area, one irrigation plot in the plain of Pierrelaye–Bessancourt, is located about 24 km northwest of Paris, covering a surface of 15 ha. According to Baize *et al.* (2002), this site was amended for 102 years with the municipal wastewater of Paris and used for monoculture of grain maize over the 30 last years. In the middle of 1960 this area was also amended with urban sludge and smut compost. Since the past 20 years soil has been irrigated from wastewater from a treatment plant system. The soil is a sandy neoluvisoil typical from the Seine alluvial valley presenting a high percentage of sand and a neutral pH (Table 17). Twenty-four samples were collected in three areas chosen according to their level of heavy metal contamination. Three plots were considered as control, i.e. nearby field never irrigated with wastewater. Five sampling per plots composed one sample. At the time of sampling, soil was either uncovered or planted with corn.

Table 17. Physicochemical characteristics of soil samples from the Pierrelaye-Bessancourt plain.

Soil samples	Cd mg kg ⁻¹	Pb mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹	clay %	Silt %	Sand %	pH water	Organic carbon %
Control	0.34	37	57	11.8	12.3	75.9	8.33	1.98
Control	0.25	34	65	7.5	10.9	81.6	8.23	1.39
Control	0.94	95	178	9.8	14.8	75.4	8.09	2.29
4	1.7	188	464	10.7	16.9	72.5	7.23	2.78
5	3.9	447	979	6.2	14.2	79.6	7.43	3.51
6	7.2	521	1326	9.1	17.9	73	7.41	5.22
7	2.4	506	1336	5.8	11.1	83.2	7.39	2.93
8	3.0	202	491	6.3	12.3	81.2	7.4	3.01
9	1.8	283	715	7	11.4	81.6	7.65	1.97
10	1.7	224	465	6.1	10.6	83.3	7.42	2.12
11	34	295	814	6.9	12.3	80.8	7.33	2.59
12	5.9	274	697	9.6	17	73.4	7.47	2.76
13	2.2	129	327	8.9	12	79.2	7.73	1.71
14	1.3	130	240	7.2	10.1	82.7	7.49	1.45
15	2.1	158	401	5.6	6.3	88.1	7.19	1.73
19	1.2	141	220	12.2	13.1	74.7	7.86	3.18
21	1.3	117	271	11.1	10.8	78.1	7.73	2.54
22	2.5	410	574	nd	nd	nd	7.62	8.2
23	2.8	383	622	nd	nd	nd	7.63	9.8
24	2.9	406	592	nd	nd	nd	7.59	7.41

nd: not determine

Enumeration and isolation of heterotrophic bacteria from soil samples

The total heterotrophic microflora was enumerated on TSA1/10 (Tryptic Soy Agar diluted ten fold) (Oxoïd, Dardilly, France) media supplemented with an anti-fungal agent (cycloheximide 200 mg l⁻¹ final concentration). The resistant heterotrophic microflora was enumerated on TSA1/10 supplemented with cycloheximide (200 mg l⁻¹) and antibiotic, or heavy metal. The following antibiotics were tested: the β -lactamine imipenem at the final concentration of 32 mg l⁻¹, the aminoglycoside gentamicin at the final concentration of 32 mg l⁻¹ and the quinolone ciprofloxacin at the final concentration of 4 mg l⁻¹. High concentrations were chosen in order to select resistance and not tolerance to the tested antibiotics. Mercury resistance was determined by adding HgCl₂ at the final concentration of 10 μ M, cadmium by adding CdCl₂ at the final concentrations of 0.1, 0.5, and 1.25 mM and zinc by adding ZnCl₂ at the final concentrations of 0.5, 3 and 10 mM. Bacterial cells were extracted by blending 5 g of soil with 50 ml of a saline solution (NaCl 0.8%) for 90 s in a Waring Blender (Eberbach Corporation, New Hampshire, USA). Extractions were performed in triplicates. Homogenized soil suspensions were serially diluted in sterile saline solution, and 100 μ l of the 10⁻³ to 10⁻⁵ dilutions were spread on the agar plates for the total heterotrophic microflora and the 10⁻¹ or 10⁻² dilutions on the agar plates for the resistant heterotrophic microflora. In all cases, three plates were inoculated per dilution. Bacterial colonies were counted after 3 and 5 days of incubation at 28°C.

Identification and antibiotic and heavy metal resistant phenotypes of resistant population

Eleven or twelve isolates obtained from the 3 soil samples collected in the plots 22, 23 and 24, were chosen for each condition of growth with agar media supplemented with antibiotic or mercury (TSA1/10 + Hg²⁺, TSA1/10 + imipenem, TSA1/10 + gentamicin, TSA1/10 + ciprofloxacin). Isolates were selected to represent different colony morphotypes. Due to the low colony diversity each morphotype is represented twice to four times. Forty five isolates were identified by phylogenetic analysis of their complete 16S rRNA gene sequences using GenBank BLAST. The isolates were tested for their resistance to other compounds by plating them on TSA1/10 agar supplemented with the different antibiotics or mercury at the same concentration used to identify resistant heterotrophic bacteria (i.e.: imipenem 32 mg/l, gentamicin 32 mg/l, ciprofloxacin 4 mg/l and mercury 10 μ M). Plates were incubated at 28°C during 3 to 5 days. Isolates presenting the capacity of growing on the supplemented medium as well as the medium without supplement were considered as resistant, isolates presenting a

lower growth was considered to present an intermediate capacity of resistance and isolates presenting no capacity of growing on the supplemented medium was considered as sensitive.

Resistance genes amplification

We looked for the presence of antibiotic and mercury resistance encoding genes by PCR amplification with specific primers (Table 18). Two primer pairs were used to amplify some of the most found aminoglycoside modifying enzymes (AME) in clinical isolates, enabling resistance to gentamicin: *ant(2'')*-I (or *aadB*) and *aac(6')*-II/Ib (or *aacA4*). Two primer pairs were used to amplify the metallo- β -lactamase (MBL) encoding genes *bla_{IMP}* and *bla_{VIM}* variants, which enabling resistance to imipenem. These genes were screened because of their high prevalence in bacteria implicated in infection in the hospital and their frequent position on mobile element as integrons, transposons or plasmids, facilitating their dispersal among (opportunistic) pathogenic bacteria of different species or genera. The presence of the gene encoding the mercuric reductase named *merA* specific of Gram negative bacteria was also search by PCR amplification. PCR amplification was tested on both isolates and soil DNA. The total DNA from soil samples was extracted using the fast DNA® SPIN for soil kit (MP Biomedicals), according to the manufacturer instructions. The following PCR cycles was used: an initial denaturation step is done at 94°C during 4 min. This first step is followed by 30-35 cycles of 30 sec-1 min denaturation at 94°C, 30 sec-1 min of primer annealing at variable temperature (see table 18), 30 sec-1 min of primer extension at 72°C. Finally, a final extension was done during 8 min at 72 °C. The PCR were carried out in a 50 μ l reaction mixture containing 2,5 U of *Taq* polymerase (Q-biogen), 1X reaction buffer containing MgCl₂ (Q-biogen), 20 mM dNTP, 0,5 μ M of each primers, 1 μ l of cell lysate or 50 ng of soil DNA; 1,25 μ g of T4 gene 32 protein was added when soil DNA was tested. Amplification was verified by 2 % agarose gel electrophoresis.

Table 18. Primers used in this study.

Amplified genes	Primer Name	Primer Sequence 5'→3'	Product Size	Tm (°C)	Reference
<i>ant(2'')</i> -I	Fant	TGGGCGATCGATGCACGGCTRG	428	58	Heuer <i>et al.</i> , 2002
	Rant	AAAGCGGCACGCAAGACCTCMAC			
<i>aac(6')</i> -II/Ib	Faac6	CACAGTCGTACGTTGCKCTBGG	235	58	Heuer <i>et al.</i> , 2002
	Raac6	CCTGCCTTCTCGTAGCAKCGDAT			
<i>bla_{imp}</i>	IMP-DIA/f	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	361	52	Migliavacca, <i>et al.</i> , 2002
	IMP-DIA/r	GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT			
<i>bla_{vim}</i>	VIM-DIA/f	CAGATTGCCGATGGTGTTTGG	523	52	Lombardi <i>et al.</i> , 2002
	VIM-DIA/r	AGGTGGGCCATTCAGCCAGA			

Cloning and sequencing amplified fragments

Amplified fragments corresponding to one single band on gel electrophoresis were purified using the Minielute PCR purification kit (Qiagen) and amplified fragments associated to several bands on gel electrophoresis were purified using the QiaexII gel extraction kit (Qiagen). The purified PCR products were ligated in a pGEM-T easy vector (Promega) and transformed in *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen), according to the manufacturer instructions. Correct insertion in the plasmid was verified by PCR amplification using the M13 primers specific to the vector. The amplified fragments were sequenced and the sequences were phylogenetically analysed using GenBank BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTS

Prevalence of antibiotic and mercury resistant bacteria in the total heterotrophic microflora

Total heterotrophic microflora counts varied between $0.4 \pm 0.04 \times 10^7$ colonies forming unit (cfu) g^{-1} of soil in the soil 17 and $8.2 \pm 1.1 \times 10^7$ cfu g^{-1} of soil in the soil 4 (Figure 38). These variations were independent of the level of contamination of the soils. Spreading soil suspensions on agar media with cadmium at 1.25 mM or 0.5 mM did not lead to the isolation of resistant bacteria. Similarly no colonies were obtained with zinc added at a final concentration of 3 or 10 mM. Enumeration on the lowest concentrations of cadmium (0.1 mM) or zinc (0.5mM) evidenced almost no difference with the enumeration on agar media without metal since colonies represent at least 10% of the total heterotrophic bacteria in the contaminated and non contaminated soil samples.

The level of antibiotic and mercury resistant heterotrophic microflora varied between soils (Figure 39). The highest prevalences of resistance were observed in the most contaminated soils. In control plots, i.e. non contaminated soils, gentamicin resistant heterotrophic bacterium counts varied from 0.3 ± 0.5 to $18.7 \pm 6 \times 10^3$ cfu g^{-1} of soil in soils 3 and 1 respectively, representing from 0.002 to 0.16 % of the total heterotrophic microflora. In contaminated plots, resistant heterotrophic bacterium counts varied from 3.4 ± 0.5 to $95.7 \pm 19.8 \times 10^3$ cfu g^{-1} of soil in soils 24 and 6 respectively, representing from 0.005 to 0.5 % of the total heterotrophic microflora. Half of the contaminated plots presented a proportion of resistant heterotrophic bacteria lower than the one present in control plots.

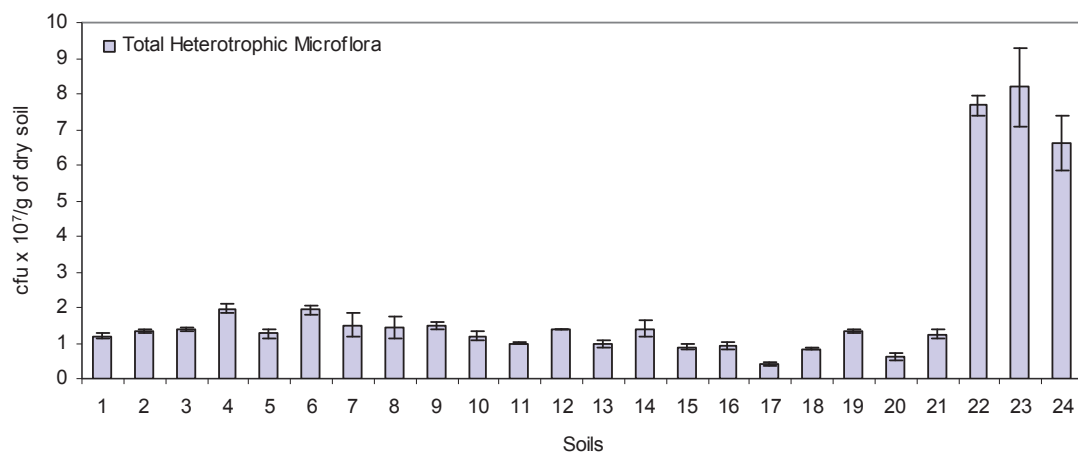


Figure 38. Numbers (colony forming unit g⁻¹) of viable heterotrophic bacteria in soil samples.

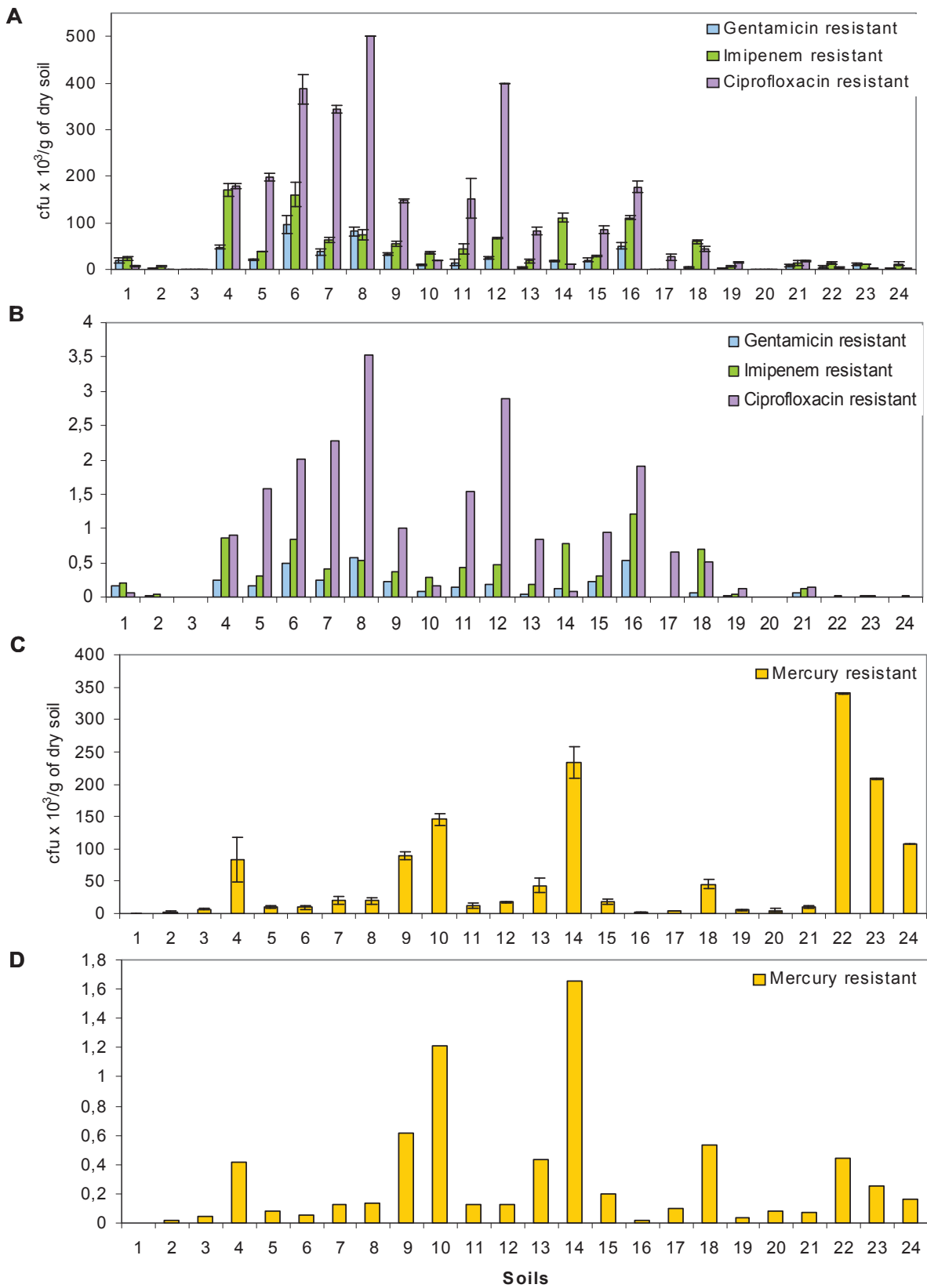


Figure 39. Numbers (colony forming unit g⁻¹) of antibiotic (A) and Hg (C) heterotrophic resistant bacteria in soil samples and proportion (%) of resistant bacteria in the total heterotrophic microflora (B and D).

In control plots, imipenem resistant heterotrophic bacterium counts varied from 0.7 ± 0.5 to $23.7 \pm 4.6 \times 10^3$ cfu g⁻¹ of soil in plots 3 and 1 respectively, representing from 0.004 to 0.2 % of the total heterotrophic microflora. In contaminated plots, resistant heterotrophic bacterium counts varied from 11.3 ± 1 to $170.3 \pm 14.7 \times 10^3$ cfu g⁻¹ of soil in soils 23 and 4 respectively, representing 0.01 to 0.9 % of the total heterotrophic microflora. Heigt plots presented a proportion of resistant heterotrophic bacteria lower than the one present in control plots. Two control plots (2 and 3) were devoid in ciprofloxacin resistant heterotrophic microflora. Soil 1 contained $7 \pm 0.8 \times 10^3$ cfu g⁻¹ of soil. In contaminated plots, resistant heterotrophic bacterium counts varied from 1.2 ± 0.4 to 500×10^3 cfu g⁻¹ of soil in soils 24 and 8, respectively, representing from 0.002 to 3.5 % of the total heterotrophic microflora. Only 4 soils presented a proportion of resistant heterotrophic bacteria lower than the one present in control plots. We also observed that contaminated soil 20 was devoid of gentamicin, imipenem and ciprofloxacin resistant heterotrophic bacteria and soil 17 was devoid of gentamicin and imipenem resistant heterotrophic bacteria.

Regarding mercury resistance, we observed in control soils that mercury resistant heterotrophic bacterium counts varied from 0 to $6.7 \pm 0.5 \times 10^3$ cfu g⁻¹ of soil in soil 1 and 3, respectively, representing from 0 to 0.05 % of the total heterotrophic microflora. In contaminated plots, mercury resistant heterotrophic bacterium counts varied from 1.7 ± 0.5 to $341.1 \pm 1 \times 10^3$ cfu g⁻¹ of soil in plots 16 and 22, respectively, representing 0.02 and 0.4 % of the total heterotrophic microflora. The highest proportion of mercury resistant heterotrophic bacteria (1.6 %) was found in soil 14. Only 4 soils presented a proportion of resistant heterotrophic bacteria lower than the one present in control plots.

Identification of resistant bacteria

Among the 45 selected isolates, 24 were Gram positive bacteria and 21 were Gram negative bacteria (Figure 40). The homology with the closest relatives in GenBank ranged from 95 to 100 %. Twelve bacterial genera were found, representing the total diversity of resistant bacteria. Gram positive bacteria were represented by 4 genera: *Arthrobacter* (*A. nitroguajacolicus* (2 isolates), *A. aurescens* (1), *Arthrobacter* sp. (6)), *Bacillus* (*B. megaterium* (8), *Bacillus* sp.(1)), *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. (5)) and *Microbacterium* (*Microbacterium* sp.(1)).

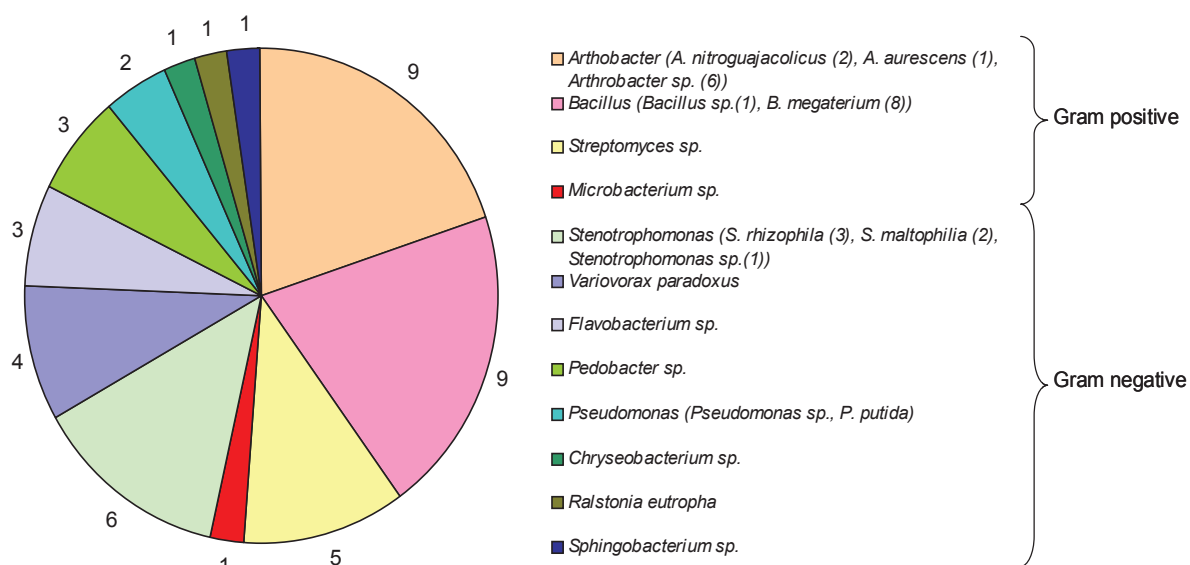


Figure 40. Identification of selected resistant isolates.

Table 19. Diversity of resistant bacteria.

	Ciprofloxacin resistant	Gentamicin resistant	Imipenem resistant	Mercury resistant
<i>Arthrobacter</i>	9	-	-	-
<i>Bacillus</i>	-	-	-	9
<i>Streptomyces</i>	-	-	5	-
<i>Microbacterium</i>	1	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	6	-
<i>Variovorax</i>	-	4	-	-
<i>Flavobacterium</i>	-	3	-	-
<i>Pedobacter</i>	2	1	-	-
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	2
<i>Chryseobacterium</i>	-	1	-	-
<i>Ralstonia</i>	-	1	-	-
<i>Sphingobacterium</i>	-	1	-	-

Gram negative bacteria were represented by 8 genera: *Stenotrophomonas* (*S. rhizophila* (3 isolates), *S. maltophilia* (2), *Stenotrophomonas* sp. (1)), *Variovorax* (*V. paradoxus* (4)), *Flavobacterium* (*Flavobacterium* sp. (3)), *Pedobacter* (*Pedobacter* sp. (3)), *Pseudomonas* (*P. putida* (1), *Pseudomonas* sp. (1)), *Chryseobacterium* (*Chryseobacterium* sp. (1)), *Ralstonia* (*R. eutropha* (1)), and *Sphingobacterium* (*Sphingobacterium* sp. (1)). However, this diversity did not reflect the diversity obtained for each condition (Table 19). The diversity of gentamicin resistant bacteria was the highest with 6 genera: *Variovorax* (6 isolates), *Flavobacterium* (4), *Pedobacter* (1), *Chryseobacterium* (1), *Ralstonia* (1), and *Sphingobacterium* (1). Ciprofloxacin resistant bacteria were represented by 3 genera: *Arthrobacter* (9 isolates), *Pedobacter* (2), *Microbacterium* (1). Imipenem resistant bacteria were represented by 2 genera: *Streptomyces* (5 isolates) and *Stenotrophomonas* (6). Mercury resistant bacteria were also represented by 2 genera: *Bacillus* (9 isolates) and *Pseudomonas* (2) (Table 19).

Multi-resistant bacteria

Most of the isolates (99.4 %) were able to grow in presence of several toxicants (i.e. antibiotics: imipenem, gentamicin, ciprofloxacin and mercury). Only 3 isolates (0.6 %) grew only on their original medium: TSA1/10 + 10 μM Hg^{2+} . Five isolates (11 %) were able to grow in presence of 2 toxicants, 18 isolates (40 %) were able to grow in presence of 3 toxicants and 19 isolates (42.2 %) were able to grow in presence of the 4 tested toxicants. However, full multi-resistance, was less frequent. Nine isolates were resistant to 2 toxicants (Table 20). These isolates belonged to the *Arthrobacter* (3 isolates), *Variovorax* (2), *Pedobacter* (2) and *Streptomyces* (2) genera. The most frequent association was resistance to gentamicin and ciprofloxacin (in 4 isolates) but resistance to ciprofloxacin and mercury, ciprofloxacin and imipenem, gentamicin and imipenem, imipenem and mercury were also observed. Seven isolates were resistant to 3 toxicants and belonged to the *Arthrobacter* (1 isolate), *Pedobacter* (1), *Variovorax* (1) and *Stenotrophomonas* (4). All the possible associations were observed. One Isolate was resistant to the 4 tested toxicants and was identified as *Stenotrophomonas* sp.

Table 20. Multi-resistance in the selected resistant isolates.

Multi-resistance	Type of resistances	Number of multi-resistant bacteria	Identification
2 resistances	CIP/Hg ²⁺	1	<i>A. nitroguajacolicus</i>
	CIP/IPM	1	<i>Pedobacter sp.</i>
			<i>A. aurescens, V. paradoxus, Pedobacter</i>
	CIP/GEN	4	<i>sp., Arthrobacter sp.</i>
	GEN/IPM	2	<i>V. paradoxus, Streptomyces sp.</i>
3 resistances	IPM/Hg ²⁺	1	<i>Streptomyces sp.</i>
	CIP/GEN/Hg ²⁺	2	<i>A. nitroguajacolicus, Pedobacter sp.</i>
	GEN/IPM/Hg ²⁺	2	<i>S. rhizophila, S. maltophilia</i>
	CIP/IPM/Hg ²⁺	1	<i>S. rhizophila</i>
4 resistances	CIP/IPM/GEN	2	<i>V. paradoxus, S. maltophilia</i>
	CIP/IPM/GEN/Hg ²⁺	1	<i>Stenotrophomonas sp.</i>

Presence of resistance genes

Presence of gentamicin, imipenem and mercury resistance genes was investigated by PCR with specific primers in both the isolates and total soil DNA. *MerA* gene specific to Gram negative bacterium was found in all the tested soils and in 3 isolates, *Ralstonia eutropha*, *Stenotrophomonas rhizophila* and *Pseudomonas putida*, which presented the capacity of growing in presence of mercury salts. No amplification was observed with primers allowing the amplification of *aac(6')*-II/Ib gentamicin resistance and the *bla_{VIM}* imipenem resistance genes in both the isolates and the soil DNA. Positive amplification was obtained with primers allowing amplification of the *ant(2'')*-I gentamicin resistance genes in several isolates (6 *Arthrobacter* and 1 *Stenotrophomonas*). However, the sequence of amplified fragments did not correspond to gentamicin resistance gene. Finally, a positive amplification with primers specific to the *bla_{IMP}* imipenem resistance gene was obtained in the soil 14. Sequencing and comparing the amplified sequence to the GenBank database using BLAST tool revealed the presence in this soil of the *bla_{IMP8}* variant (sequence homology = 97 %).

DISCUSSION

Antibiotic resistances are widespread in the environment in response to the presence of antibiotics due to microbial competition, or anthropogenic activities (Martinez, 2009). Several

studies have already suggested that antibiotic resistance capacities could be elevated in heavy metal contaminated terrestrial and aquatic environments (Stepanauskas, *et al.*, 2005, Wright, *et al.*, 2006, Matyar, *et al.*, 2008, Oyetibo, *et al.*, 2009). Here we investigated the prevalence of antibiotic and heavy metal resistance bacteria among the total heterotrophic microflora in soil samples of the Pierrelaye-Bessancourt plain (Val d'Oise, France) a chronically contaminated site. Non-contaminated fields (i.e. not submitted to irrigation with wastewater), possessing the same geo-chemical characteristics, were sampled and served as control. We showed that the proportion of antibiotic resistant bacteria within the total heterotrophic community was variable between the plots, independently of the level of contamination but the highest prevalence was observed in the most heavy metal contaminated samples (Figure 39A and B). Gentamicin, imipenem and ciprofloxacin resistant heterotrophic bacteria represented until 0.58 %, 0.9 % and 3.5 % of the total heterotrophic microflora present in contaminated plots, respectively. However, the results presented here are not sufficient to affirm that presence of heavy metals in this site was responsible for the selection of antibiotic resistance. Indeed, several contaminated soils were characterized by proportion of antibiotic resistant heterotrophic bacteria lower than the one present in control soils. Especially, half of the soils did not present a proportion of gentamicin resistant heterotrophic bacteria higher than the one in control plots (0.16 %). Moreover, we failed to find antibiotic resistant heterotrophic bacteria in the contaminated soil 20 and only ciprofloxacin resistant heterotrophic bacteria were found in the contaminated soil 17. Absence or low level of antibiotic resistance in these heavy metal contaminated soils could be due to absence of co-selection to antibiotic and heavy metal in the indigenous bacterial community, only enabling heavy metal resistance selection in presence of high heavy metal concentrations. In this case, heavy metal resistant bacteria would represent a high proportion of the community. Concerning mercury, we observed that most of the contaminated soils presented higher proportion of resistant heterotrophic bacteria than control soils, representing until 1.6 % of the total heterotrophic microflora (Figure 39C and D). However, we were not able to detect zinc and cadmium resistant heterotrophic bacteria when the highest concentrations of zinc (3 and 10 mM) and cadmium (0.5 and 1.25 mM) were added to the culture medium. This result was rather surprising since isolates from heavy metal contaminated sites frequently presented resistance to higher concentrations (Matyar *et al.*, 2008, Oyetibo *et al.*, 2009). Our results suggested that heavy metals present in the site of Pierrelaye might not be available for the microbial community and then did not lead to resistance mechanism selection to survive in presence of these toxicants. Since organic matter is present in high concentration (Table 17) due to

exogenous sources (added waste contained dioxine, hydrocarbons,...) we hypothesize that organic compounds entrapped heavy metals making them non available for the microbial community (Calace & Petronio, 2004, Kumpiene, *et al.*, 2008). Presence of other selective pressures that could act even at low concentrations, especially antibiotics due to the presence of producers or anthropogenic intake due to the use of wastewater to irrigate the plots could participate to the variability observed considering the proportion of antibiotic resistant bacteria in the different soils of Pierrelaye. Anthropogenic activities could also be responsible for the increase of resistant bacteria in this site especially by direct intake of resistant isolates present in non-treated wastewater (Schwartz, *et al.*, 2006, Martinez, 2009).

Forty five resistant isolates were selected from the different supplement agar media and identified by sequencing their almost complete 16S rRNA gene (i.e. 1400 bp). These isolates belonged to 12 different genera (Figure 40). Diversity for each toxicant resistant bacteria group was low (Table 19): only 2 genera represented mercury and imipenem resistant bacteria, 3 genera represented ciprofloxacin resistant bacteria and 6 genera represented gentamicin resistant bacteria. Most of the identified genera (or species) are known to be widespread in the environment for a long time, especially in soil, as *Stenotrophomonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. Within each genus some species are also known to cause infection in fragilised people and are qualified as opportunistic pathogens. Among the identified isolates of our study, the Gram positive *Arthrobacter* and *Bacillus* genera were the most represented. Species of the *Arthrobacter* genus are considered as the most frequent coryneform bacteria in soil and have been recently identified (in the 1990s) in clinical samples (Mages, *et al.*, 2008). The most frequently involved in infections are *A. cummingsii*, *A. oxydans* and *A. aurescens*. The former was detected in our study. It is interesting to note that the clinical *Arthrobacter* spp. generally showed little resistance to antibiotics, except quinolone. No information is available concerning antibiotic resistance capacity of environmental *Arthrobacter*. However, all the *Arthrobacter* sp. we isolated in our study were selected for their ciprofloxacin (quinolone) resistance. We could hypothesize that an intrinsic resistance mechanism could be responsible for the quinolone resistance phenotype. However, to our knowledge, no antibiotic resistance mechanism has been identified in *Arthrobacter* spp. All the isolates identified as *Bacillus* spp., most of them identified as *B. megaterium*, were recovered from mercury supplemented agar, suggesting their high capacity to resist to mercury. This observation was not surprising since the widespread of the Gram positive specific *mer* operon among *Bacillus* species has already been reported (Bogdanova, *et al.*, 1998). Furthermore, a new *mer* operon, *TnmerR11* transposon,

has been recently described in a *B. megaterium* strain (Chen, *et al.*, 2008). *Bacillus* spp., as *B. megaterium* has also been reported as responsible for infection as endocarditis, sepsis or meningitis, in the hospital (Citron & Appleman, 2006). Therapy of choice to treat these infections consists of vancomycin, imipenem, gentamicin or ciprofloxacin therapy. The sensitivity to these antibiotics observed in clinical strains could explain the fact that in our study, *Bacillus* spp. were not able to resist to the tested antibiotics (gentamicin, imipenem, ciprofloxacin). Regarding *Streptomyces* spp., these species are saprophytic bacteria, frequently found in soils and well known for their antibiotic production. These bacteria are also capable of causing infection called mycetomas (tumefaction of soft tissue and bone). Other invasive infections, as pulmonary or bloodstream infections are rare but occur in immunocompromised patients (Kapadia, *et al.*, 2007). Little information is available concerning antibiotic resistance in clinical *Streptomyces*. Reports of the literature generally show a high antibiotic sensitivity, but also some resistance to imipenem, clarithromycin, erythromycin, amoxicillin-clavulanate, trimethoprim /sulfamethoxazole and frequent resistant to ceftriaxone, ciprofloxacin, and ampicillin are observed. In our study, *Streptomyces* bacteria were all recovered from imipenem supplemented agar, suggesting the high capacity of imipenem resistance of environmental strains. No information is available concerning imipenem resistance mechanisms in this genus. However species within that genus were the first to be described as carbapenem producers (Demain, 1991). *Stenotrophomonas* spp. were the most frequent resistant gram negative species identified in our study. These species are known for their versatility and their high capacity of adaptation (Ryan, *et al.*, 2009). Soil, especially rhizosphere, is considered as a reservoir of *Stenotrophomonas* species and some of them are known for their capacity to promote plant growth or their potential use in bioremediation (Berg, 2009). Within the *Stenotrophomonas* genus, the species *S. maltophilia* is also known as an important opportunistic pathogen, representing the third non fermenting Gram negative bacterium implicated in nosocomial infections (Jones, *et al.*, 2003) and increasingly found in cystic fibrosis patients (Razvi, *et al.*, 2009). Sequencing of the genome of the clinical K279a strain and the environmental R551-3 strain revealed a high intrinsic resistance capacity due to the presence of a high number of gene implicated in drug resistance (Crossman, *et al.*, 2008, Taghavi, *et al.*, 2009). Intrinsic resistance in *S. maltophilia* is due to the presence of broadly specific efflux pumps such as SmeABC and SmeDEF, two metallo- β -lactamases allowing resistance to imipenem, two aminoglycoside modifying enzymes (AME) allowing resistance to aminoglycosides and Qnr allowing resistance to quinolones (Sanchez, *et al.*, 2009). This intrinsic resistance could explain that Gram negative resistant isolates were

identified as *Stenotrophomonas* spp. However, little information is available on species of this genus other than *S. maltophilia*, but our results suggested that some of them, as *S. rhizophila* could also have a high capacity of resistance (Table 20). *Arthrobacter* was also frequently found as multi-resistant in our study. This result was rather surprising since clinical isolates seem not highly resistant (Mages, *et al.*, 2008). However, we only tested 3 currently used antibiotics and a more complete antibiotic susceptibility test needs to be done.

The results presented here suggested that anthropogenic activities as irrigation with wastewater that participate to increase the concentrations of different toxicants as antibiotics, heavy metals or organic compounds, could favor the emergence, dispersion and / or maintenance of antibiotic resistant bacteria. Identification of resistant bacteria led to the conclusion that potentially human opportunistic pathogens species and genera widespread in soil (i.e. even in non contaminated soil) dominates also resistant bacterial community. The selective pressure undergone by these isolates could be responsible for their tolerance to several toxicants. However, “full” resistance and multi-resistance were rare. We observed that several genera were specifically isolated from one toxicant supplemented agar medium, as *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas* or *Bacillus*, which have been respectively isolated from ciprofloxacin, imipenem and mercury supplemented agar medium. We can wonder if these particular resistance capacities were due to intrinsic resistance capacity or to the spread of mobile genetic element bearing antibiotic resistance determinants. In order to provide some answer, we searched for the presence of resistance genes by PCR using primers specific of determinants often present on mobile elements in both the 45 selected isolates and the soil DNAs. *merA* encoding mercuric reductase was investigated in Gram negative isolates and in soils (with primers specific to Gram negative bacteria). This gene was recovered from 3 isolates and all tested soils, in both contaminated and non contaminated soil. This result confirmed that the *mer* operon is widespread in the environment, whether mercury is present or not in high concentrations as previously demonstrated through *mer* operon diversity studies (Bruce, *et al.*, 1995, Bruce, 1997, Osborn, *et al.*, 1997). The presence of aminoglycoside modifying enzyme (AME) and metallo- β -lactamase (MBL) encoding genes was also investigated. Neither *ant(2'')*-I or *aac(6')*-II/Ib AME types was found in the resistant isolates as well as in soil DNA. This result was surprising as we chose to research these determinants because of their occurrence in soil (Heuer, *et al.*, 2002). Other antibiotic resistance mechanisms could enable aminoglycoside resistance as efflux or membrane impermeability (Poole, 2004). Moreover, we could not conclude that no AME were present in the investigated site, as other variants exist as *aac(3)* types and could also be found in soil, even at a lower

rate. We also observed the absence of the *bla*_{VIM} encoding metallo-β-lactamase (MBL) type and the presence of a *bla*_{IMP8} variant in the contaminated soil 14, in which imipenem resistant microflora was one of the highest (Figure 39). Acquired MBL, permitting resistance to carbapenems, are increasingly found in clinical isolates (Walsh, 2005, Gould, 2008). *bla*_{IMP} types are predominantly found in Asia, but several strains possessing *bla*_{IMP} have also been found in Europe (Walsh, *et al.*, 2005). Only one report presented the recovered of a *bla*_{IMP19} variant in a clinical isolate in France (Neuwirth, *et al.*, 2007). This determinant is generally found in Gram negative bacteria like *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and in Enterobacteriaceae like *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp. (Walsh, *et al.*, 2005). In the environment, presence of MBL is poorly documented and only one study reports the presence of *bla*_{IMP} variants in a highly polluted estuary (Henriques, *et al.*, 2006). To our knowledge, our study is the first report of the presence of a *bla*_{IMP} variant in soil, especially in a highly polluted French site. However, we observed the absence of this variant in all tested isolates, suggesting that observed imipenem resistance was due to other mechanisms. Among *S. maltophilia* isolates, the presence of chromosomally encoded MBL could be responsible for intrinsic imipenem resistance (Sanchez, *et al.*, 2009).

Presence of such determinants in soil could participate to the emergence of highly resistant bacteria under selective pressure resulting from anthropogenic activities. As resistant isolates belonged to genera widespread in soils and some species belonging to these genera were qualified as opportunistic pathogens, we can wonder if any environmental isolates could emerge as nosocomial pathogens and if anthropogenic pressure in the environment selecting both intrinsic and acquired antibiotic resistant isolates could increase the probability of such isolates to become an opportunistic pathogen.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the ANR-CES-RESACOR project of the French “Ministère de la Recherche” and a ADEME/SIAPP project from the Val d’Oise department. A. Deredjian was funded by a grant from the CNRS. We thank Christian Dron for soil sampling and physicochemical analysis and Charlyne Lespré for technical assistance in molecular biology.

REFERENCES

- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R & McArthur JV (2006).** Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14: 176-182.
- Baize D (2002).** Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français. *Courrier de l'environnement de l'INRA* 22.
- Berg G (2009).** Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 11-18.
- Bogdanova ES, Bass IA, Minakhin LS, et al. (1998).** Horizontal spread of *mer* operons among gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiology* 144 (Pt 3): 609-620.
- Bruce KD (1997).** Analysis of *mer* Gene Subclasses within Bacterial Communities in Soils and Sediments Resolved by Fluorescent-PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Appl Environ Microbiol* 63: 4914-4919.
- Bruce KD, Osborn AM, Pearson AJ, Strike P & Ritchie DA (1995).** Genetic diversity within *mer* genes directly amplified from communities of noncultivated soil and sediment bacteria. *Mol Ecol* 4: 605-612.
- Calace N & Petronio BM (2004).** The role of organic matter on metal toxicity and bio-availability. *Ann Chim* 94: 487-493.
- Chen CY, Hsieh JL, Silver S, Endo G & Huang CC (2008).** Interactions between two *MerR* regulators and three operator/promoter regions in the mercury resistance module of *Bacillus megaterium*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 2403-2410.
- Citron DM & Appleman MD (2006).** In vitro activities of daptomycin, ciprofloxacin, and other antimicrobial agents against the cells and spores of clinical isolates of *Bacillus* species. *J Clin Microbiol* 44: 3814-3818.
- Cook PP, Catrou PG, Christie JD, Young PD & Polk RE (2004).** Reduction in broad-spectrum antimicrobial use associated with no improvement in hospital antibiogram. *J Antimicrob Chemother* 53: 853-859.
- Crossman LC, Gould VC, Dow JM, et al. (2008).** The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9: R74.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW & Wright GD (2006).** Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311: 374-377.
- Demain AL (1991).** Production of beta-lactam antibiotics and its regulation. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 15: 251-265.

Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M & Blaghen M (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr Microbiol* 41: 151-156.

Gould IM (2008). The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 1: S2-9.

Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ & Correia A (2006). Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 418-429.

Heuer H, Krogerrecklenfort E, Wellington EM, et al. (2002). Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 289-302.

Jones RN, Sader HS & Beach ML (2003). Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents* 22: 551-556.

Kapadia M, Rolston KV & Han XY (2007). Invasive *Streptomyces* infections: six cases and literature review. *Am J Clin Pathol* 127: 619-624.

Kaszab E, Kriszt B, Atzel B, Szabo G, Szabo I, Harkai P & Szoboszlay S (2009). The Occurrence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* on Hydrocarbon-Contaminated Sites. *Microb Ecol*.

Kummerer K (2009). Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* 75: 417-434.

Kumpiene J, Lagerkvist A & Maurice C (2008). Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments--a review. *Waste Manag* 28: 215-225.

Levy SB & Marshall B (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: S122-129.

Liebert CA, Hall RM & Summers AO (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 507-522.

Mages IS, Frodl R, Bernard KA & Funke G (2008). Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter*-like bacteria encountered in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 46: 2980-2986.

Martinez JL (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157: 2893-2902.

Martinez JL & Baquero F (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 15: 647-679.

- Matyar F, Kaya A & Dincer S (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci Total Environ* 407: 279-285.
- McGowan JE, Jr. (2006).** Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control* 34: S29-37; discussion S64-73.
- Neuwirth C, Siebor E, Robin F & Bonnet R (2007).** First occurrence of an IMP metallo-beta-lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 4486-4488.
- Osborn AM, Bruce KD, Strike P & Ritchie DA (1997).** Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon. *FEMS Microbiol Rev* 19: 239-262.
- Oyetibo GO, Ilori MO, Adebusoye SA, Obayori OS & Amund OO (2009).** Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and antibiotics in Nigerian contaminated systems. *Environ Monit Assess* 168: 305-314.
- Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL & Kohler T (2004).** CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279: 8761-8768.
- Poole K (2004).** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 10: 12-26.
- Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B & Saiman L (2009).** Respiratory Microbiology of Patients With Cystic Fibrosis in the United States, 1995-2005. *Chest*.
- Riesenfeld CS, Goodman RM & Handelsman J (2004).** Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 6: 981-989.
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, et al. (2009).** The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7: 514-525.
- Sanchez MB, Hernandez A & Martinez JL (2009).** *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiol* 4: 655-660.
- Schwartz T, Volkmann H, Kirchen S, Kohnen W, Schon-Holz K, Jansen B & Obst U (2006).** Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 158-167.
- Slama TG (2008).** Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care* 12 Suppl 4: S4.

- Stepanauskas R, Glenn TC, Jagoe CH, Tuckfield RC, Lindell AH & McArthur JV (2005).** Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ Sci Technol* 39: 3671-3678.
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, et al. (2009).** Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75: 748-757.
- Walsh TR (2005).** The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 11 Suppl 6: 2-9.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L & Nordmann P (2005).** Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18: 306-325.
- Wright GD (2007)** The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 5: 175-186.
- Wright MS, Loeffler Peltier G, Stepanauskas R & McArthur JV (2006).** Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiol Ecol* 58: 293-302.

Conclusions

L'originalité de cette étude repose d'une part, sur un échantillonnage des sols réalisé selon un transect de contamination, avec sur le même site des parcelles présentant des niveaux de contamination variables en fonction des métaux du fait de l'utilisation des eaux usées non traitées de la ville de Paris pendant près d'un siècle ; ainsi que des parcelles non contaminées n'ayant pas subi l'irrigation avec les eaux usées et présentant des caractéristiques géochimiques identiques à celles des parcelles contaminées. D'autre part, nous avons recherché la présence de gènes de résistance préférentiellement retrouvés chez des isolats cliniques tels que *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* ou encore *Vibrio cholerae* et faisant l'objet de peu d'études dans l'environnement.

Les résultats obtenus après dénombrement de la communauté résistante aux antibiotiques des différents sols n'ont pas suffi à mettre en évidence un rôle des contaminations métalliques dans la sélection de résistance aux antibiotiques dans les sols contaminés du site de Pierrelaye, en tout cas pour les antibiotiques testés, i. e. gentamicine, imipénème et ciprofloxacine. En effet, même si les effectifs les plus élevés ont été obtenus à partir d'échantillons de sols des parcelles les plus contaminées, nous avons observé dans un certain nombre de parcelles l'absence de résistance ou des effectifs inférieurs à ceux présents dans les sols témoin (jusqu'à la moitié des sols en ce qui concerne la gentamicine). De plus, il apparaît de plus en plus probable que les métaux présents dans ces sols ne seraient pas disponibles pour la communauté bactérienne étant donné que nous n'avons pas détecté de résistants au zinc et au cadmium lorsque des concentrations pour lesquelles les isolats issus d'environnements contaminés sont fréquemment résistants étaient ajoutées au milieu de culture. La non disponibilité des métaux dans ce site serait liée à leur piégeage par la matière organique présente en grande quantité. Ces composés organiques ont une source exogène (apportés par l'irrigation avec les eaux usées) et sont caractérisés par un niveau d'humification élevé entraînant une faible dégradation. L'exception concerne le mercure pour lequel nous avons observé que la proportion de résistants à 10 μM de Hg^{2+} pouvait représenter jusqu'à 1,6 % de la microflore hétérotrophe totale. Les pressions favorisant la sélection de résistance aux antibiotiques dans ce site sont donc à ce jour, inconnues. Toutefois, la présence d'antibiotiques, d'une part liée à la production bactérienne et d'autre part, à l'apport lié aux activités anthropiques menées sur ce site pourrait avoir largement participé à la sélection de

ces résistances. Il serait donc intéressant de mesurer les concentrations en antibiotiques présentes dans ces sols pour évaluer cette pression. Il est également probable que les activités menées sur ce site aient été responsables de l'enrichissement des sols en bactéries résistantes par un apport direct par les eaux usées.

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a conduit à l'identification des isolats résistants et à l'évaluation de la diversité de ces résistants. Deux à six genres bactériens représentent les communautés résistantes, reflétant une faible diversité. Ces communautés sont représentées par des genres et des espèces bactériens tels que *S. maltophilia*, *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., connus pour leur large distribution dans l'environnement, en particulier dans les sols. De plus, tous les genres et les espèces identifiés sont connus pour leur implication dans des infections nosocomiales et peuvent être qualifiés de bactéries pathogènes opportunistes. Chez ces isolats, la tolérance à plusieurs composés toxiques (antibiotiques et mercure) est fréquente, en revanche, la résistance à plusieurs de ces composés est plutôt rare. Les isolats les plus fréquemment multi-résistants appartiennent aux genres *Stenotrophomonas* et *Arthrobacter*. Peu d'informations sont disponibles en ce qui concerne les capacités de résistance de ce dernier de même que concernant les mécanismes qui pourraient être à l'origine de ces résistances. En ce qui concerne le genre *Stenotrophomonas*, seule l'espèce *S. maltophilia* fait l'objet de nombreuses études. Comme nous avons pu le constater précédemment, elle est d'ailleurs caractérisée par un grand nombre de déterminants génétiques permettant une résistance intrinsèque aux composés toxiques. Toutefois, nous n'avons testé que 3 antibiotiques et ne sommes pas en mesure de parler réellement de multi-résistances. Il s'agit plutôt d'un moyen de comparer les isolats du site de Pierrelaye entre eux. Pour évaluer réellement les capacités de multi-résistance de ces isolats, il faudrait tester un plus grand nombre de molécules. Les antibiogrammes de certains isolats appartenant au genre *Stenotrophomonas* ont été établis (VITEK2) et ont montré une sensibilité à la plupart des molécules, confirmant les faibles capacités de résistance des souches isolées de ce site par rapport aux souches isolées des autres sites étudiés (résultats non montrés).

La recherche des gènes de résistance aux aminoglycosides et aux carbapénèmes, généralement portés par des éléments génétiques mobiles, a été infructueuse chez tous les isolats. Même si nous n'avons pas recherché tous les déterminants pouvant être à l'origine de ces résistances, ces résultats suggèrent que les résistances observées seraient plutôt dues à des mécanismes intrinsèques de résistance. Cette hypothèse pourrait également expliquer pourquoi on observe si peu de diversité au sein des communautés résistantes. Si les

résistances étaient dues à la présence d'éléments génétiques mobiles, une plus grande diversité aurait été observée. La recherche de ces gènes dans l'ADN extrait des sols a conduit à mettre en évidence la présence du gène *bla_{IMP}* codant pour une métallo-β-lactamase présent dans un sol fortement contaminé. La présence de ce gène, mis en évidence à différentes reprises dans des clones multi-résistants impliqués dans des épidémies, en particulier en Asie (Walsh, *et al.*, 2005), n'a fait l'objet que de peu d'études dans l'environnement et n'a été mis en évidence que dans un site estuarien contaminé (Henriques, *et al.*, 2006). Ainsi, ce gène pourrait être retrouvé dans des environnements impactés par différentes activités anthropiques, pouvant être responsables de son introduction et/ou de son maintien, et sa présence dans les sols pourrait contribuer à augmenter les risques de transmission et d'acquisition par des souches indigènes du sol, représentant potentiellement un risque de santé publique.

Conclusions (English version)

The originality of this study is based in one hand on a soil sampling conducted according to a transect of contamination, with in the same site, plots presenting variable level of contaminations depending on the metals due to the use of non treated wastewater from Paris during a century, as well as non contaminated soils with geochemical characteristics similar to the contaminated plots; in the other hand on the search for resistance genes rarely studied in the environment and preferentially found among clinical isolates as *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* or *Vibrio cholerae*.

The results obtained after enumeration of the antibiotic resistant community did not enable to highlight a role of heavy metal contaminations in the selection of antibiotic resistance in the contaminated soils of Pierrelaye, at least for the tested antibiotics, i. e. gentamicin, imipenem and ciprofloxacin. Indeed, even if the highest effectives were obtained from samples from the most contaminated plots, we observed in several contaminated plots, the absence of resistant bacteria or lower effectives than the ones present in non contaminated plots (half of the plots for gentamicin). We hypothesize that most of the metals present in these soils is not available for the bacteria since we failed to detect zinc and cadmium resistant bacteria when concentrations for which isolates from contaminated sites are frequently resistant were added to the culture medium. The non-availability of the metals of this site could be due to their strong adsorption to organic compounds present in high quantity. These organic compounds are of exogenous sources (brought by irrigation with waste) and are characterized by their high level of “humification” resulting in a low degradation. The exception concerns mercury for which we observed that bacteria resistant to 10 μM de Hg^{2+} could represent up to 1,6 % of the total heterotrophic microflora. Pressures favoring antibiotic resistance selection in this site are actually unknown. However, antibiotic presence due to bacterial production and linked to anthropogenic activities could largely contribute to resistance selection. It would be interesting to measure antibiotic concentrations present in these soils to evaluate this pressure. It is also likely that activities on this site could be responsible for the enrichment of resistant bacteria in soil by direct intake with wastewater.

Sequencing of the 16S rRNA gene led to the identification of the resistant isolates and to the evaluation of their diversity. From 2 to 6 bacterial genera represented resistant populations,

suggesting a low diversity. These populations were represented by bacterial genera and species like *S. maltophilia*, *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., known for their wide distribution in the environment, especially in soils. Moreover, all genera and species identified are also known for their implication in nosocomial infections and can be qualified as opportunistic pathogens. In these isolates, tolerance to several toxic compounds (antibiotics and mercury) is common; however, full resistance to several compounds is rather rare. Multi-resistant isolates belonged to *Stenotrophomonas* and *Arthrobacter* genera. Little information is available regarding the resistance of the latter as well as on mechanisms that could be responsible to this resistance. Considering the *Stenotrophomonas* genus, only *S. maltophilia* is the subject of numerous studies. As we previously observed, this species is characterized by high number of genetic determinants implicated in intrinsic resistance to several toxic compounds. However, we only tested 3 antibiotics and cannot really talk about multi-resistance. It is just a way to compare isolates from Pierrelaye to each other. In order to evaluate multi-resistance capacities of these isolates, a higher number of antibiotic molecules should be tested. Antibiotic susceptibility tests were done for several isolates belonging to the *Stenotrophomonas* genus and showed a sensitive phenotype for most of the tested molecules, confirming the low resistance capacities of strains isolated from this site comparing to strains from other sites (data not shown).

We investigated the genes implicated in resistance to aminoglycosides and carbapenems, known to be frequently found on mobile elements. These genes were absent whatever the isolates. Even if we do not search all determinants found on mobile elements, this result suggests that observed resistance could be due to intrinsic resistance. This hypothesis could also explain the low diversity observed among the resistant populations. If these resistances were due to the presence of mobile elements, a higher diversity would have been observed. Search for these genes in DNA extracted from soils led to detection of the *bla_{IMP}* gene encoding a metallo- β -lactamase, in a highly contaminated soil. This gene is often found in multi-resistant clones responsible of epidemic, especially in Asia (Walsh *et al.*, 2005), but its presence is poorly studied in the environment and was only reported in a contaminated estuary (Henriques *et al.*, 2006). This gene could be found in environments impacted by anthropogenic activities that could be responsible of its intake and / or maintenance. Its presence in soils could contribute to increase the risk of acquisition by indigenous strains that represent a risk in public health.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

COCLUSIONS AND PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'origine, l'importance et le rôle des résistances aux antibiotiques dans l'environnement ainsi que les facteurs influençant l'acquisition de ces résistances par les bactéries font actuellement l'objet de nombreux questionnements. La présence de métaux lourds pourrait notamment participer à l'acquisition de résistance aux antibiotiques par des phénomènes de co-sélection de résistance aux métaux et aux antibiotiques (Baker-Austin *et al.*, 2006, Berg *et al.*, 2004). Les études relatives au rôle des métaux dans cette co-sélection sont majoritairement conduites à l'échelle des communautés sans tenir compte de la présence de populations particulières pouvant présenter un intérêt en santé publique. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était de mieux appréhender le rôle des contaminations métalliques liées à diverses activités anthropiques dans les sols sur la co-sélection de résistance aux métaux et aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes opportunistes *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*.

Une étude préliminaire a été de combler un manque d'informations relatives à la présence, la distribution et l'abondance de ces modèles dans les sols. En effet, bien que ces bactéries soient considérées comme ubiquistes et présentes dans un large panel d'environnements, de telles données sont peu nombreuses et relativement anciennes. Pour mener à bien ce travail, nous avons choisi d'utiliser deux approches complémentaires : l'une largement utilisée pour des études épidémiologiques qui implique l'isolement des populations de *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* après ensemencement sur des milieux sélectifs, associée à la confirmation de l'identité des isolats selon des critères phénotypiques et/ou génétiques, et l'autre indépendante de la culture et reposant sur une détection au niveau de l'ADN extrait directement à partir des échantillons à analyser. Si l'approche indépendante de la culture est un bon complément à l'approche cultivable puisqu'elle permet la détection de cellules viables non cultivables et peut refléter la persistance de l'ADN indépendamment de la survie de cellules intègres, cette approche telle qu'utilisée dans cette étude s'est révélée peu sensible. L'utilisation de la PCR quantitative en temps réel serait à envisager car elle montre généralement une plus grande sensibilité que la PCR classique. Cet outil non disponible au moment de la réalisation de mes travaux est aujourd'hui disponible au sein de l'équipe BPOE et a fait l'objet d'optimisation et de calibration pour être utilisé à partir d'échantillons de sols. Son utilisation est en cours sur les environnements étudiés.

Nos travaux nous ont amené à constater une distribution différente des modèles dans les sols, confirmant que *S. maltophilia* serait indigène des sols puisqu'elle a été mise en évidence dans les sols de tous les sites étudiés alors que *P. aeruginosa*, présente de façon sporadique dans les sols étudiés, devrait sa présence à un apport externe par l'eau d'irrigation ou les amendements organiques (fumier). La présence de contaminants tels que les composés organiques ou les métaux lourds pourrait favoriser le maintien ou la multiplication de ces espèces connues pour leur capacité de résistance et de dégradation de molécules organiques.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux capacités de résistance aux métaux et aux antibiotiques des souches environnementales isolées des différents sites étudiés précédemment et les avons comparées avec celles de souches d'origine hospitalière afin de mettre en évidence des pressions sélectives favorables à l'acquisition et au maintien de ces résistances. Nous avons dû pallier à l'absence de *P. aeruginosa* dans les sols choisis pour leur niveau supposé de contaminations [Nabeul (Tunisie), Ouagadougou (Burkina Faso) et Pierrelaye (France)] et avons pour cela élargi notre étude à l'impact d'autres types de pressions sélectives telles que les hydrocarbures dans les sols, les contaminations multiples (détergent, molécules organiques) dans les eaux de lagune d'épuration, ou la présence d'antiseptiques utilisés pour le soin de serpents captifs. La collection de souches environnementales de *S. maltophilia* était, quant à elle, constituée des souches provenant de sites présentant des niveaux de contaminations croissants, déterminés en fonction de la nature des apports (présence de métaux, molécules organiques) et de la durée d'exposition : le site de Feucherolles (sols non contaminés en France), le site de Nabeul (sols non contaminés en métaux lourds irrigués par des eaux potentiellement contaminées en métaux en Tunisie), les sites de la périphérie de Ouagadougou (sols amendés par des déchets et contaminés en zinc au Burkina Faso) et le site de Pierrelaye (sols fortement contaminés en métaux et en composés organiques en France).

Les résultats obtenus ont confirmé que la présence de fortes concentrations en antibiotiques dans l'environnement hospitalier était la pression majeure responsable de la sélection et du maintien des résistances aux antibiotiques chez les deux espèces étudiées. A l'exception de ce point commun, de nombreuses différences ont été mises en évidence entre les deux modèles. D'une part les souches hospitalières de *P. aeruginosa* présentent peu de résistance aux métaux alors que celle de *S. maltophilia* présentent fréquemment des résistances aux quatre métaux testés. D'autre part, les souches d'origine environnementale de *P. aeruginosa* sont pour la plupart caractérisées par une faible capacité de résistance aux antibiotiques (phénotype sauvage de résistance) et une importante capacité de résistance aux métaux (surtout Zn et Cd).

Cependant, quelques souches isolées d'environnements particuliers, contaminés en hydrocarbures ou de serpents captifs ont montré une capacité de résistance à 5 antibiotiques. Dans tous les cas, nous n'avons pas pu mettre en évidence de co-sélection de résistance aux métaux et aux antibiotiques. A l'opposé, les souches d'origine environnementale de *S. maltophilia* ont montré des capacités de résistance aux métaux et aux antibiotiques variables en fonction des sites d'isolement. Les souches isolées des sites français de Feucherolles et Pierrelaye sont peu résistantes, alors que les souches isolées des sites de Nabeul (Tunisie) et Ouagadougou (Burkina Faso) présentent des capacités de résistance similaires à celles des souches d'origine hospitalière. La présence de souches présentant des capacités de résistance aux antibiotiques aussi importantes que celles de souches hospitalières dans l'environnement peut avoir un impact en santé publique. Toutefois, la réussite de la colonisation du milieu hospitalier et en particulier de l'infection fait également intervenir d'autres propriétés. Notamment, il semble indispensable d'évaluer les capacités de virulence de ces souches telles que la formation de biofilm, la mobilité ou la capacité à excréter des toxines afin d'évaluer le risque de la présence de tels isolats dans l'environnement. Ces résultats suggèrent une adaptation importante des populations de *S. maltophilia* aux conditions qui caractérisent leur niche d'origine, liées à la fois à l'origine géographique des sites et aux activités anthropiques menées sur ces sites, entraînant une diversité infra-spécifique importante. Il semble toutefois difficile d'attribuer l'importante capacité de résistance de certaines souches environnementales de *S. maltophilia* à la pression métallique présente dans les sols du fait des activités anthropiques telles que l'irrigation avec des eaux usées ou l'amendement avec des déchets urbains bruts. En effet, les activités anthropiques à l'origine des contaminations métalliques sont souvent responsables de l'apport d'autres contaminants tels que les molécules organiques et peuvent également participer à l'augmentation des concentrations en antibiotiques. C'est pourquoi nous avons plutôt envisagé les effets de l'anthropisation et des contaminations qui en résultent de façon globale sur la sélection et le maintien des résistances. L'adaptation aux conditions environnementales rencontrées par *S. maltophilia* dans sa niche écologique serait également à l'origine de variations génotypiques participant à la diversité infra-spécifique. Ainsi, les variations phénotypiques ne seraient pas seulement liées à des niveaux d'expressions et des phénomènes de régulation mais pourraient également s'expliquer par des différences génotypiques (présence / absence des gènes recherchés). A l'opposé, la présence des gènes de résistance aux métaux chez toutes les souches de *P. aeruginosa* suggère que les variations phénotypiques observées seraient préférentiellement

liées à des phénomènes de régulation. Pour vérifier ces hypothèses, il serait nécessaire de mesurer l'expression de ces gènes en présence d'une pression métallique ou antibiotique. Certaines caractéristiques des génomes des deux modèles pourraient expliquer les différences observées à la fois dans leur distribution et leur capacité de résistance aux métaux et aux antibiotiques. Un grand nombre de déterminants génétiques impliqués dans la résistance à des composés toxiques a été mis en évidence dans la partie conservée des génomes séquencés des souches K279a d'origine clinique et R551-3 d'origine environnementale de *S. maltophilia* (Crossman *et al.*, 2008, Taghavi *et al.*, 2009, Rocco *et al.*, 2009). La présence de déterminants participant à la formation de mécanismes généraux comme les pompes à efflux, pourrait être à l'origine de la résistance à différentes molécules, par exemple antibiotiques et métaux et entraîner des phénomènes de résistance croisée. Le génome de *P. aeruginosa* est quant à lui caractérisé par un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation (Stover *et al.*, 2000, Rodrigue *et al.*, 2000), propriété importante pour le mode de vie d'un pathogène opportuniste et permettant de s'adapter rapidement à des variations des conditions environnementales. Des phénomènes de co-régulation de résistance aux métaux et aux antibiotiques ont d'ailleurs été mis en évidence chez cette espèce (Perron *et al.*, 2004). Toutefois, notre étude ne nous a pas permis d'identifier ce type de co-sélection de résistance. Il semble d'ailleurs indispensable de mesurer les niveaux d'expression des gènes potentiellement impliqués pour mettre en évidence de tels phénomènes. Les différences observées entre les deux modèles peuvent également s'expliquer par la composition de leur génome accessoire et leur capacité à acquérir des résistances par transfert horizontal. Chez les deux modèles, le génome accessoire est caractérisé par la présence de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques ou aux métaux, pouvant entraîner une diversité phénotypique infra-spécifique. L'acquisition d'éléments génétiques mobiles portant à la fois des gènes de résistance aux métaux et aux antibiotiques peut entraîner des phénomènes de co-résistance sous la pression métallique ou antibiotique dans l'environnement ou le milieu hospitalier. Dans notre étude, l'acquisition simultanée de gènes de résistance à un antibiotique et au mercure chez des souches d'origine hospitalière sous la pression antibiotique pourrait expliquer la présence du gène *merA* associée à l'absence de phénotype chez les deux modèles. De plus, nous avons montré que certains déterminants *merA* pouvaient être associés à des profils de résistance aux antibiotiques particuliers chez des souches hospitalières de *P. aeruginosa*, peut être du fait de phénomènes de co-résistance.

L'étude réalisée sur la communauté indigène des sols du site de Pierrelaye suggère que les métaux lourds présents en grande quantité dans ces sols ne seraient pas disponibles pour les bactéries. En effet, bien que les plus forts effectifs de bactéries résistantes aux antibiotiques aient été mis en évidence dans des sols contaminés, nous avons observé que d'une part, plusieurs sols contaminés étaient caractérisés par une plus faible prévalence de bactéries résistantes aux antibiotiques que les sols non contaminés ; et d'autre part que les capacités de résistance aux métaux (zinc et cadmium) de la microflore hétérotrophe totale étaient faibles. Ainsi, les concentrations en métaux mesurées dans les sols ne reflètent pas forcément les concentrations disponibles pour les populations. Il est donc difficile d'évaluer spécifiquement le rôle des métaux sur la co-sélection de résistance. Pour évaluer précisément le rôle attribuable aux métaux, des travaux impliquant la réalisation de microcosmes et un meilleur contrôle des apports pourraient être envisagés. Notamment, l'apport progressif ou direct d'un métal dans un sol non-contaminé comme par exemple celui du site de Feucherolles ou dans les sols témoins non amendés des différents sites étudiés pourrait permettre d'évaluer l'effet précis d'une pollution mono- ou polymétallique sur l'augmentation des capacités de résistance de la communauté indigène ou celles de populations particulières.

Dans cette étude nous nous sommes également intéressés aux espèces bactériennes résistantes à l'imipénème, la gentamicine et la ciprofloxacine, trois antibiotiques fréquemment utilisés en milieu clinique. Cette identification a révélé une faible diversité au sein de ces communautés, suggérant que les pressions anthropiques présentes sur ce site pourraient ne favoriser le maintien et la dispersion que d'espèces / genres bactériens présentant des capacités de résistance particulières. Ainsi, ces pressions favoriseraient la sélection de deux types de populations, d'une part, les populations présentant des capacités de résistance intrinsèques telles que *S. maltophilia* qui est préférentiellement isolées à partir d'un milieu supplémenté en imipénème pour lequel cette espèce présente une capacité intrinsèque de résistance grâce à la présence dans son génome de gènes codant pour deux métallo- β -lactamases ; d'autre part d'espèces ou genres bactériens présentant des capacités à acquérir des éléments génétiques mobiles. Dans ce dernier cas, la présence de déterminants génétiques responsables de résistance aux antibiotiques présents sur des éléments génétiques mobiles peut réellement influencer la composition de la communauté indigène en présence d'une pression sélective. Ces déterminants peuvent être considérés comme des contaminants dont la présence peut être liée à différentes activités anthropiques, responsables de leur apport, de leur maintien et de leur dispersion dans l'environnement (Martinez *et al.*, 2009). Dans notre étude, la recherche de gènes de résistance aux antibiotiques généralement portés par des éléments génétiques

mobiles a montré la présence du gène *bla*_{IMP}, codant pour une métallo-β-lactamase, dans un sol contaminé du site de Pierrelaye. Ce gène est fréquemment retrouvé chez des isolats cliniques multi-résistants de différentes espèces de pathogènes opportunistes telles que *Acinetobacter baumannii* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2005). La présence de ce gène dans l'environnement est peu étudiée et il n'a été mis en évidence à ce jour que dans des eaux usées (Pellegrini *et al.*, 2009). Sa présence dans les sols étudiés pose également la question de l'importance des phénomènes d'acquisition et de dispersion de ce gène par des souches environnementales qui peuvent potentiellement entraîner des infections chez des personnes fragilisées et être par la suite dispersées dans le milieu hospitalier. En effet, nous avons pu constater que l'identification des isolats représentant la microflore hétérotrophe résistante aux antibiotiques testés a mis en évidence la présence majoritaire d'espèces ou de genres bactériens également connus pour leur implication dans des infections nosocomiales telles que *S. maltophilia*, *Streptomyces* spp. ou *Bacillus* spp. Du fait que ce gène est peu recherché, on peut se demander s'il est fréquemment répandu ou si ce sont les pressions sélectives présentes dans ce site qui le maintienne. Il serait donc intéressant d'évaluer la prévalence de ce gène sur d'autres sites, contaminés ou non. Une étude complémentaire serait également d'identifier les espèces portant le gène *bla*_{IMP} dans le sol de Pierrelaye et d'évaluer le rôle de ce gène sur leur capacité de résistance aux β-lactamines, voire de mettre en évidence un rôle indépendant de la résistance aux antibiotiques, qui pourrait expliquer la présence de ce gène sans pression sélective directe apparente (antibiotiques). L'étude de l'environnement génétique de ce gène chez les espèces porteuses pourrait également mettre en évidence des phénomènes possibles de co-résistance s'il est positionné sur un élément génétique mobile portant d'autres gènes de résistance.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES (English version)

The origin, significance and role of antibiotic resistance in the environment and the factors influencing the acquisition of resistance in bacteria are currently matter of debate. The presence of heavy metals could contribute to the acquisition of antibiotic resistance by antibiotic and heavy metal resistance co-selection (Baker-Austin *et al.*, 2006, Berg *et al.*, 2004). Studies aiming at evaluating the role of metals in resistance co-selection are mostly conducted at the community scale without interest to specific populations that could be relevant in public health. In this context, the aim of this thesis was to better understand the role of metal contaminations related to various anthropogenic activities in soils on antibiotic and heavy metal resistance co-selection in the opportunistic bacterial pathogens *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*.

A preliminary study was to address a lack of information concerning the presence, distribution and abundance of these models in soils. Although these species are considered ubiquitous bacteria, present in a wide range of environments, such data are scarce and relatively old. To carry out this work, we chose to use two complementary approaches: the first one is widely used for epidemiological studies and involves the isolation and quantification of populations of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* after plating on selective media, combined with confirmation of the isolate identity by phenotypic and / or genetic criteria; the second one is a culture-independent method, based on a detection from DNA directly extracted from soil samples. The culture-independent approach was less sensitive despite it is a good complement to the culture-dependent approach because it enables the detection of viable but non-culturable cells, but may reflect the persistence of DNA after the death of cells. Real time quantitative PCR would be to consider because it generally shows a higher sensitivity than classic PCR. This molecular tool was not available at the time I realized the study, but can be used now as it has been optimized and calibrated to be used with soil DNA extracts by the BPOE team.

Nevertheless, we observed a different distribution of the 2 species in soils, confirming that *S. maltophilia* could be indigenous in soils as it has been recovered from all tested soils, whereas *P. aeruginosa*, is sporadically present in tested soils, probably due to an external intake by irrigation water or organic amendments (manure). The presence of contaminants such as

organic compounds or heavy metals could contribute to the maintenance or spread of these species, known for their resistance and degradation of organic molecules capacities.

Then we evaluated antibiotic and heavy metal resistance capacities of environmental strains isolated from the different sites previously studied and compared them to the ones of hospital strains in order to identify selective pressure that favor acquisition and maintenance of these resistances. We had to overcome the absence of *P. aeruginosa* in soils chosen for their supposed exposure and/or level of contamination [Feucherolles (uncontaminated and unexposed agricultural soil, France), Nabeul (lack of heavy metal contamination in soil but potential exposure to heavy metal through irrigation with wastewater, Tunisia), sub-urban area of Ouagadougou (exposure to multi-contaminant through urban waste amendment and zinc contamination of soil, Burkina Faso) and Pierrelaye (high level of heavy metal in soil and exposure to multi-contaminant through waste water irrigation, France)]. We then expanded our study to the impact of other types of selective pressures such as oil in soils, multiple contaminations (detergent, organic molecules) in water from treatment plants systems, and antiseptics used for the care of healthy captive snakes. The environmental strain collection of *S. maltophilia* was composed of strains from sites presenting increasing level of contamination, depending on the nature of the intake (heavy metal, organic compound presence) and the time of exposure as mentioned above (Feucherolles, Nabeul, Ouagadougou and Pierrelaye).

The results confirmed that the presence of high antibiotic concentrations in the hospital was the major driving force for the selection and maintenance of antibiotic resistance in both species. Nevertheless, many differences were found between the two models. In one hand, hospital strains of *P. aeruginosa* present little resistance to metals, whereas strains of *S. maltophilia* often exhibit resistance to the four tested metals. In the other hand, most of environmental strains of *P. aeruginosa* are characterized by low antibiotic resistance capacity and high heavy metal resistance capacity (especially Zn and Cd). Some strains isolated from particular environments as hydrocarbon contaminated soils or healthy captive snakes, were resistance up to 5 antibiotics. In all cases, we failed to evidence antibiotic and heavy metal resistance co-selection. On the opposite, environmental strains of *S. maltophilia* showed variable capacity of resistance depending on their original site. Strains isolated from French sites of Feucherolles and Pierrelaye presented low resistance whereas strains from Nabeul (Tunisia) and Ouagadougou (Burkina Faso) presented resistance capacities similar to the ones of strains from the hospital. Presence of strains presenting antibiotic resistance capacity similar to the one of clinical strains in the environment could have major consequences in

public health. However, the success of colonizing the hospital and causing infection also involves other properties. For instance, it seems essential to evaluate the virulence capacities of these strains as biofilm formation, mobility or ability to excrete toxins, to evaluate the risk of the presence of such isolates in the environment. These results suggest an important adaptation of *S. maltophilia* populations to conditions that characterize their original niche and that are due to both their geographical origin and human activities conducted at these sites, leading to a significant intra-specific diversity. It is difficult to attribute to heavy metals the selection of antibiotic resistance in environmental strains of our study. Indeed, human activities that cause metal contaminations are often responsible for the intake of other contaminants such as organic molecules which may also participate to the increase of antibiotic concentrations. Consequently, it was rather difficult to differentiate the effect of heavy metals from the effect of other toxicants. That is why we rather considered the effects of the global human activities on the selection and maintenance of resistance.

This intra-specific diversity was also suggested by the variability in the prevalence of antibiotic and metal resistance gene. Adaptation to environmental conditions encountered by *S. maltophilia* in its original niche could also be implicated in genotypic variations that contribute to the intra-specific diversity. Phenotypic differences could not only be related to gene expression levels and regulation but could also be explained by genotypic differences (presence / absence of genes). On the opposite, presence of heavy metal resistance genes in all strains of *P. aeruginosa* suggests that phenotypic variations could preferentially be linked to regulation phenomena. In order to test this hypothesis, it would be necessary to measure expression of these genes under metal or antibiotic pressure in well controlled experiments.

Some genome characteristics within each species could explain their different behaviour considering their distribution in soils and antibiotic and heavy metal resistance. A high number of genetic determinants implicated in resistance to toxic compounds was evidenced in the conserved part of the sequenced genomes of the clinical K279a strain and the environmental R551-3 strain of *S. maltophilia* (Crossman *et al.*, 2008, Taghavi *et al.*, 2009, Rocco *et al.*, 2009). Presence of determinants encoding general mechanisms as efflux pumps could be responsible to the resistance to different molecules as antibiotics and metals and lead to cross-resistance phenomena. *P. aeruginosa* genome is characterized by a high number of genes implicated in regulation (Stover *et al.*, 2000, Rodrigue *et al.*, 2000), a major property for the way of life of opportunistic pathogens enabling to adapt quickly to change in environmental conditions. Phenomena of antibiotic and heavy metal resistance co-regulation have already been demonstrated in this species (Perron *et al.*, 2004). However, our study did

not enable to identify such resistance co-selection. It also seems necessary to measure the expression levels of genes potentially involved to demonstrate such phenomena. Differences between the two models could also be explained by the composition of their accessory genome and their ability to acquire resistance by horizontal transfer. In both models, accessory genome is characterized by the presence of heavy metal and antibiotic resistance genes that could lead to intra-specific diversity. Acquisition of mobile elements bearing both antibiotic and heavy metal resistance genes could lead to co-resistance phenomena in both the hospital and the environment. In our study, simultaneous acquisition of antibiotic and mercury resistance genes in hospital strains under antibiotic selective pressure could explain the presence of *merA* gene despite the resistance phenotype in both models. Moreover, we showed that *merA* determinants could be associated to particular antibiotic resistance profiles in hospital strains of *P. aeruginosa* due to co-resistance phenomena.

The study conducted on the indigenous community of Pierrelaye suggests that heavy metals, presents in high concentrations, might not be available for bacteria. Indeed, despite the presence of the highest prevalence of antibiotic resistant bacteria in highly contaminated soils, we observed in one hand that several contaminated soils were characterized by a lower prevalence of antibiotic resistant bacteria than non contaminated soils. On the other hand heavy metal resistance capacities of the indigenous microflora were low. So metal concentrations measured in soils do not necessarily reflect the available concentrations for the indigenous bacterial community. In order to precisely evaluate heavy metal role in resistance selection, microcosms and a better control of heavy metal intakes would need to be performed. Progressive or direct intake of a metal in a non-contaminated soil, like soil from the site of Feucherolles or control soils in the different studied sites, could enable to evaluate the effect of a mono- or poly-metallic pollution on the increase of resistance capacity in the indigenous community as well as in particular populations.

This study also enables to identify representative bacteria from the microflora resistant to imipenem, gentamicin and ciprofloxacin, some antibiotics which are frequently used in the hospital. Results showed a low diversity among the resistant populations, suggesting that anthropogenic pressures present in this site could favor the maintenance and spread of few bacterial species and genera presenting particular resistance. These pressures could favor the selection of two types of population, populations that present intrinsic resistance capacities as *S. maltophilia* which had been recovered from medium supplemented with imipenem and presenting intrinsic resistance to imipenem due to the presence of two metallo- β -lactamases;

and bacterial species presenting high capacities for the acquisition of genetic mobile elements. In this case, presence of genetic determinants implicated in antibiotic resistance and present on mobile elements can really influence the composition of the indigenous community in presence of selective pressure. These determinants can be considered as contaminants which presence may be linked to various human activities that are responsible for their intake, their maintenance and their spread in the environment (Martinez *et al.*, 2009). In our study, research of antibiotic resistance genes, usually present on mobile elements showed the presence of the *bla*_{IMP} gene, encoding a metallo- β -lactamase, in one of the most contaminated soil. This gene is often found in multi-resistant clinical isolates of different opportunistic pathogen species like *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* (Walsh *et al.*, 2005). Presence of this gene in the environment is poorly investigated and was only demonstrated in wastewater (Pellegrini *et al.*, 2009). Its presence in the studied soils raises the question of the process involved in this gene acquisition by environmental strains that can potentially cause infections in vulnerable individuals and subsequently be spread in the hospital. Indeed, we observed that the identification of isolates representing the antibiotic (gentamicin, ciprofloxacin and imipenem) resistant heterotrophic microflora showed the predominant presence of species or genera also known for their role in nosocomial infections as *S. maltophilia*, *Streptomyces* spp. ou *Bacillus* spp. As the presence of this gene is poorly investigated, we wonder if it is naturally present in soil environment or if the contaminants of these soils act as a selective pressure for its presence. It would be interesting to assess the prevalence of this gene in other sites, contaminated or not. A complementary study would also be to identify the species carrying the *bla*_{IMP} gene in the soil of Pierrelaye and to study its role in β -lactam resistance or to highlight an alternative role that could explain the presence of this gene with no apparent direct selective pressure (antibiotics). The study of the genetic environment of this gene in the vector species could help in identifying co-resistance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
REFERENCES

- A -

- Achudume AC & Olawale JT (2009).** Occurrence of antibiotic resistant bacteria in waste site of Ede south west Nigeria. *J Environ Biol* 30: 187-189.
- Adams BG & Marrie TJ (1982).** Hand carriage of aerobic gram-negative rods may not be transient. *J Hyg (Lond)* 89: 33-46.
- Aendekerck S, Ghysels B, Cornelis P & Baysse C (2002).** Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 148: 2371-2381.
- Ahemad M & Khan MS (2010).** Phosphate-solubilizing and plant-growth-promoting *Pseudomonas aeruginosa* PS1 improves greengram performance in quizalafop-p-ethyl and clodinafop amended soil. *Arch Environ Contam Toxicol* 58: 361-372.
- Albini S, Abril C, Franchini M, Hussy D & Filioussis G (2009).** *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the airways of animals with chronic respiratory disease. *Schweiz Arch Tierheilkd* 151: 323-328.
- Alonso A & Martinez JL (2001).** Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1879-1881.
- Alonso A, Rojo F & Martinez JL (1999).** Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* 1: 421-430.
- Alonso A, Campanario E & Martinez JL (1999).** Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145 (Pt 10): 2857-2862.
- Alonso A, Sanchez P & Martinez JL (2000).** *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1778-1782.
- Alonso A, Sanchez P & Martinez JL (2001).** Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 3: 1-9.
- Anaissie EJ, Penzak SR & Dignani MC (2002).** The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. *Arch Intern Med* 162: 1483-1492.
- Antonoli P, Lampis S, Chesini I, Vallini G, Rinalducci S, Zolla L & Righetti PG (2007).** *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02, a new bacterial strain suitable for bioremediation of selenite-contaminated environmental matrices. *Appl Environ Microbiol* 73: 6854-6863.
- Atzel B, Szoboszlay S, Mikuska Z & Kriszt B (2008).** Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Hyg Environ Health* 211: 143-155.
- Aubron C, Poirel L, Fortineau N, Nicolas P, Collet L & Nordmann P (2005).** Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microb Drug Resist* 11: 254-259.
- Avison MB, von Heldreich CJ, Higgins CS, Bennett PM & Walsh TR (2000).** A TEM-2beta-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 46: 879-884.

- B -

- Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M & Hoiby N (2002).** Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3406-3411.

- Baize D (2002).** Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français. *Courrier de l'environnement de l'INRA* 22.
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R & McArthur JV (2006).** Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 14: 176-182.
- Ball MM, Carrero P, Castro D & Yarzabal LA (2007).** Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolívar State, Venezuela). *Curr Microbiol* 54: 149-154.
- Barben J, Hafen G & Schmid J (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* in public swimming pools and bathroom water of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 4: 227-231.
- Barbolla R, Catalano M, Orman BE, et al. (2004).** Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 666-669.
- Bartha R (1977).** The microbiology of aquatic oil spills. *Adv Appl Microbiol* 22: 225-266.
- Battle SE, Rello J & Hauser AR (2009).** Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 290: 70-78.
- Battle SE, Meyer F, Rello J, Kung VL & Hauser AR (2008).** Hybrid pathogenicity island PAGO-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J Bacteriol* 190: 7130-7140.
- Berg G (2009).** Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 11-18.
- Berg G, Marten P & Ballin G (1996).** *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape - Occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiological Research [MICROBIOL. RES.]* 151: 19-27.
- Berg G, Roskot N & Smalla K (1999).** Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* 37: 3594-3600.
- Berg G, Eberl L & Hartmann A (2005).** The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* 7: 1673-1685.
- Berg J, Tom-Petersen A & Nybroe O (2005).** Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett Appl Microbiol* 40: 146-151.
- Berka RM, Gray GL & Vasil ML (1981).** Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 34: 1071-1074.
- Bert F, Branger C & Lambert-Zechovsky N (2002).** Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 50: 11-18.
- Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, Ros A, Lucht F & Pozzetto B (2005).** [Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*]. *Pathol Biol (Paris)* 53: 341-348.
- Bhattacharya M, Roy SS, Biswas D & Kumar R (2000).** Effect of Mg²⁺ ion in protein secretion by magnesium-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water of Haldia port. *FEMS Microbiol Lett* 185: 151-156.
- Binks PR, Nicklin S & Bruce NC (1995).** Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl Environ Microbiol* 61: 1318-1322.
- Bischoff KM, White DG, Hume ME, Poole TL & Nisbet DJ (2005).** The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 243: 285-291.
- Bogdanova ES, Bass IA, Minakhin LS, et al. (1998).** Horizontal spread of *mer* operons among gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiology* 144 (Pt 3): 609-620.

- Bourennane H, Dere C, Lamy I, Cornu S, Baize D, van Oort F & King D (2006).** Enhancing spatial estimates of metal pollutants in raw wastewater irrigated fields using a topsoil organic carbon map predicted from aerial photography. *Sci Total Environ* 361: 229-248.
- Bouskill NJ, Barnhart EP, Galloway TS, Handy RD & Ford TE (2007).** Quantification of changing *Pseudomonas aeruginosa* *sodA*, *htpX* and *mt* gene abundance in response to trace metal toxicity: a potential in situ biomarker of environmental health. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 276-286.
- Brodsky MH & Nixon MC (1973).** Rapid method for detection of *Pseudomonas aeruginosa* on MacConkey agar under ultraviolet light. *Appl Microbiol* 26: 219-220.
- Brown VI & Lowbury EJ (1965).** Use of an improved cefrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Pathol* 18: 752-756.
- Bruce KD (1997).** Analysis of *mer* Gene Subclasses within Bacterial Communities in Soils and Sediments Resolved by Fluorescent-PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Appl Environ Microbiol* 63: 4914-4919.
- Bruce KD, Osborn AM, Pearson AJ, Strike P & Ritchie DA (1995).** Genetic diversity within *mer* genes directly amplified from communities of noncultivated soil and sediment bacteria. *Mol Ecol* 4: 605-612.

- C -

- Caille O, Rossier C & Perron K (2007).** A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 4561-4568.
- Calace N & Petronio BM (2004).** The role of organic matter on metal toxicity and bio-availability. *Ann Chim* 94: 487-493.
- Canton R, Valdezate S, Vindel A, Sanchez Del Saz B, Maiz L & Baquero F (2003).** Antimicrobial susceptibility profile of molecular typed cystic fibrosis *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and differences with noncystic fibrosis isolates. *Pediatr Pulmonol* 35: 99-107.
- Casanovas-Massana A, Lucena F & Blanch AR (2010).** Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006. *J Microbiol Methods*.
- Cavalca L, Confalonieri A, Larcher S & Andreoni V (2000).** Evolution of a degradative bacterial consortium during the enrichment of naphtha solvent. *J Appl Microbiol* 88: 1009-1018.
- Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM & Wu WJ (2004).** Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 53: 518-521.
- Chapalmadugu S & Chaudhry GR (1993).** Isolation of a constitutively expressed enzyme for hydrolysis of carbaryl in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 175: 6711-6716.
- Chen CY, Hsieh JL, Silver S, Endo G & Huang CC (2008).** Interactions between two MerR regulators and three operator/promoter regions in the mercury resistance module of *Bacillus megaterium*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 2403-2410.
- Cho JC & Tiedje JM (2000).** Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl Environ Microbiol* 66: 5448-5456.
- Cho JJ, Schroth MN, Kominos SK & Green SK (1974).** Ornamental plants as carriers of *Pseudomonas aeruginosa*. *Phytopathology* 65.

- Cholley P, Thouverez M, Floret N, Bertrand X & Talon D (2008).** The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med* 34: 1428-1433.
- Chow AW, Wong J, Bartlett KH, Shafran SD & Stiver HG (1989).** Cross-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin, extended-spectrum beta-lactams, and aminoglycosides and susceptibility to antibiotic combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1368-1372.
- Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C & Greenberg EP (2001).** QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2752-2757.
- Citron DM & Appleman MD (2006).** In vitro activities of daptomycin, ciprofloxacin, and other antimicrobial agents against the cells and spores of clinical isolates of *Bacillus* species. *J Clin Microbiol* 44: 3814-3818.
- Civilini M, de Bertoldi M & Tell G (1999).** Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* 2NR degrading naphthalene. *Lett Appl Microbiol* 29: 181-186.
- Clancy J, Petitpas J, Dib-Hajj F, et al. (1996).** Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 22: 867-879.
- Clark DL, Weiss AA & Silver S (1977).** Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Pseudomonas*. *J Bacteriol* 132: 186-196.
- Colinon C, Miriagou V, Carattoli A, Luzzaro F & Rossolini GM (2007).** Characterization of the IncA/C plasmid pCC416 encoding VIM-4 and CMY-4 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 60: 258-262.
- Colinon C, Jocktane D, Brothier E, Rossolini GM, Cournoyer B & Nazaret S (2009).** Genetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from healthy captive snakes: evidence of high inter- and intrasite dissemination and occurrence of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol*.
- Conejo MC, Martinez-Martinez L, Garcia I, Picabea L & Pascual A (2003).** Effect of siliconized latex urinary catheters on the activity of carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa* strains with defined mutations in *ampC*, *oprD*, and genes coding for efflux systems. *Int J Antimicrob Agents* 22: 122-127.
- Conejo MC, Garcia I, Martinez-Martinez L, Picabea L & Pascual A (2003).** Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2313-2315.
- Cook PP, Catrou PG, Christie JD, Young PD & Polk RE (2004).** Reduction in broad-spectrum antimicrobial use associated with no improvement in hospital antibiogram. *J Antimicrob Chemother* 53: 853-859.
- Cooke P, Heritage J, Kerr K, Hawkey PM & Newton KE (1996).** Different effects of zinc ions on in vitro susceptibilities of *Stenotrophomonas maltophilia* to imipenem and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2909-2910.
- Crossman LC, Gould VC, Dow JM, et al. (2008).** The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9: R74.
- Crowder MW, Walsh TR, Banovic L, Pettit M & Spencer J (1998).** Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 921-926.

- D -

- D'Costa VM, Griffiths E & Wright GD (2007).** Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr Opin Microbiol* 10: 481-489.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW & Wright GD (2006).** Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311: 374-377.
- Dart JK (1988).** Predisposing factors in microbial keratitis: the significance of contact lens wear. *Br J Ophthalmol* 72: 926-930.
- Das K & Mukherjee AK (2007).** Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour Technol* 98: 1339-1345.
- Davey ME, Caiazza NC & O'Toole GA (2003).** Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185: 1027-1036.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW & Greenberg EP (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.
- Davies J, Spiegelman GB & Yim G (2006).** The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* 9: 445-453.
- De Meyer G & Hofte M (1997).** Salicylic Acid Produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 Induces Resistance to Leaf Infection by *Botrytis cinerea* on Bean. *Phytopathology* 87: 588-593.
- De Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Alcantara N, Martinez MB & Giron JA (2003).** Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol* 5: 625-636.
- Demain AL (1991).** Production of beta-lactam antibiotics and its regulation. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 15: 251-265.
- Denton M & Kerr KG (1998).** Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 11: 57-80.
- Denton M, Todd NJ, Kerr KG, Hawkey PM & Littlewood JM (1998).** Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *J Clin Microbiol* 36: 1953-1958.
- Deportes I, Benoit-Guyod JL, Zmirou D & Bouvier MC (1998).** Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (MSW) composting. *J Appl Microbiol* 85: 238-246.
- Dequiedt S, Thioulouse J, Jolivet C, et al. (2009).** Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environmental Microbiology Reports* 1: 251-255.
- Devliegher W, Arif M & Verstraete W (1995).** Survival and Plant Growth Promotion of Detergent-Adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl Environ Microbiol* 61: 3865-3871.
- Deziel E, Paquette G, Villemur R, Lepine F & Bisailon J (1996).** Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 62: 1908-1912.
- Diaz MA, Cooper RK, Cloeckaert A & Siebeling RJ (2006).** Plasmid-mediated high-level gentamicin resistance among enteric bacteria isolated from pet turtles in Louisiana. *Appl Environ Microbiol* 72: 306-312.
- Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M & Newman DK (2006).** The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 61: 1308-1321.
- Diggie SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Camara M & Williams P (2003).** The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency

of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* 50: 29-43.

Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Camara M, Williams P & Winzer K (2006). The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 8: 1095-1104.

Doring G, Horz M, Ortelt J, Grupp H & Wolz C (1993). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Epidemiol Infect* 110: 427-436.

Duarte GF, Rosado AS, Seldin L, de Araujo W & van Elsas JD (2001). Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (*dsz*) genes. *Appl Environ Microbiol* 67: 1052-1062.

Duineveld BM, Kowalchuk GA, Keijzer A, van Elsas JD & van Veen JA (2001). Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 67: 172-178.

Dungan RS, Yates SR & Frankenberger WT, Jr. (2003). Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment. *Environ Microbiol* 5: 287-295.

- E -

Elrod RP & Braun AC (1942). *Pseudomonas aeruginosa*: Its Role as a Plant Pathogen. *J Bacteriol* 44: 633-645.

Emerson J, McNamara S, Buccat AM, Worrell K & Burns JL (2010). Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr Pulmonol* 45: 363-370.

Engel J & Balachandran P (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 12: 61-66.

Esterman A, Roder DM, Cameron AS, Robinson BS, Walters RP, Lake JA & Christy PE (1984). Determinants of the microbiological characteristics of South Australian swimming pools. *Appl Environ Microbiol* 47: 325-328.

- F -

Fajardo A, Martinez-Martin N, Mercadillo M, et al. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One* 3: e1619.

Favero MS, Carson LA, Bond WW & Petersen NJ (1971). *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science* 173: 836-838.

Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H & Prince A (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 66: 43-51.

Figueiredo PM, Furumura MT, Santos AM, Sousa AC, Kota DJ, Levy CE & Yano T (2006). Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. *Lett Appl Microbiol* 43: 443-449.

Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M & Blaghen M (2000). Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr Microbiol* 41: 151-156.

Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F & Boyd EF (2004). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *J Clin Microbiol* 42: 5783-5792.

Flores MR, Ordoñez OF, Maldonado MJ & ME. F (2009). Isolation of UV-B resistant bacteria from two high altitude Andean lakes (4,400 m) with saline and non saline conditions. *J Gen Appl Microbiol.* 55: 447-458.

Fouhy Y, Scanlon K, Schouest K, et al. (2007). Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* 189: 4964-4968.

Foweraker J (2009). Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull* 89: 93-110.

- G -

Gagliardi JV & Karns JS (2002). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environ Microbiol* 4: 89-96.

Gaillard M, Vallaeyts T, Vorholter FJ, et al. (2006). The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. *J Bacteriol* 188: 1999-2013.

Gambello MJ & Iglewski BH (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 173: 3000-3009.

Garau J & Gomez L (2003). *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 16: 135-143.

Garbeva P, Overbeek LS, Vuurde JW & Elsas JD (2001). Analysis of Endophytic Bacterial Communities of Potato by Plating and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA Based PCR Fragments. *Microb Ecol* 41: 369-383.

Garcia-Junco M, De Olmedo E & Ortega-Calvo JJ (2001). Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. *Environ Microbiol* 3: 561-569.

Gerba CP & Smith JE, Jr. (2005). Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J Environ Qual* 34: 42-48.

Glucksman AM, Skipper HD, Brigmon RL & Domingo JW (2000). Use of the MIDI-FAME technique to characterize groundwater communities. *J Appl Microbiol* 88: 711-719.

Goldberg JB (2000). *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends Microbiol* 8: 55-57.

Gooderham WJ & Hancock RE (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 33: 279-294.

Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Rubenfeld GD & Ramsey BW (2004). Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax* 59: 955-959.

Goto S & Enomoto S (1970). Nalidixic acid cetrinide agar. A new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Microbiol* 14: 65-72.

Gould IM (2008). The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 1: S2-9.

Gould VC, Okazaki A & Avison MB (2006). Beta-lactam resistance and beta-lactamase expression in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates having defined phylogenetic relationships. *J Antimicrob Chemother* 57: 199-203.

Grasemann H (1999). Total sputum nitrate plus nitrite is raised during acute pulmonary infection in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 684-685.

Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SK & Vitanza-jack VB (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 28: 987-991.

- H -

Hammer AS, Pedersen K, Andersen TH, Jorgensen JC & Dietz HH (2003). Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mink by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 94: 237-243.

Hammond SA, Morgan JR & Russell AD (1987). Comparative susceptibility of hospital isolates of gram-negative bacteria to antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect* 9: 255-264.

Hariharan H, Coles M, Poole D, Lund L & Page R (2006). Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can Vet J* 47: 253-255.

Harris NB & Rogers DG (2001). Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis* subsp. *tetraspis*). *J Vet Diagn Invest* 13: 255-258.

Harrison F (2007). Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 153: 917-923.

Harrison JJ, Turner RJ, Joo DA, et al. (2008). Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2870-2881.

Hassan MT, van der Lelie D, Springael D, Romling U, Ahmed N & Mergeay M (1999). Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 238: 417-425.

Hassan SH, Abskharon RN, El-Rab SM & Shoreit AA (2008). Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. *J Basic Microbiol* 48: 168-176.

Hassen A, Belguith K, Jedidi N, Cherif A, Cherif M & Boudabous A (2001). Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresour Technol* 80: 217-225.

Hassett DJ, Charniga L, Bean K, Ohman DE & Cohen MS (1992). Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infect Immun* 60: 328-336.

Hawle-Ambrosch E, Riepe W, Dornmayr-Pfaffenhuemer M, Radax C, Holzinger A & Stan-Lotter H (2007). Biodegradation of fuel oil hydrocarbons by a mixed bacterial consortium in sandy and loamy soils. *Biotechnol J* 2: 1564-1568.

He J, Baldini RL, Deziel E, et al. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2530-2535.

Hejnar P, Kolar M & Sauer P (2010). Antibiotic resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from captive snakes. *Folia Microbiol (Praha)* 55: 83-87.

Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ & Correia A (2006). Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 418-429.

Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M & Parsek MR (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 183: 5395-5401.

Heuer H, Szczepanowski R, Schneiker S, Puhler A, Top EM & Schluter A (2004). The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1beta group without any accessory genes. *Microbiology* 150: 3591-3599.

- Heuer H, Krogerrecklenfort E, Wellington EM, et al. (2002).** Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 289-302.
- Hickey WJ & Focht DD (1990).** Degradation of mono-, di-, and trihalogenated benzoic acids by *Pseudomonas aeruginosa* JB2. *Appl Environ Microbiol* 56: 3842-3850.
- Hoefel D, Monis PT, Grooby WL, Andrews S & Saint CP (2005).** Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *J Appl Microbiol* 99: 175-186.
- Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, et al. (2006).** Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19890-19895.
- Hogan DA, Vik A & Kolter R (2004).** A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* 54: 1212-1223.
- Holden MT, Ram Chhabra S, de Nys R, et al. (1999).** Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 33: 1254-1266.
- Hooper DC (2000).** New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin Infect Dis* 30: 243-254.
- Houot S, Clergeot D, Michelin J, Francou C, Bourgeois S, Caria G & Ciesielski H (2002).** Agronomic Value and Environmental Impacts of Urban Composts Used in Agriculture. *Microbiology of composting*.
- Huang H, Siehnel RJ, Bellido F, Rawling E & Hancock RE (1992).** Analysis of two gene regions involved in the expression of the imipenem-specific, outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 76: 267-273.
- Huang HI, Shih HY, Lee CM, Yang TC, Lay JJ & Lin YE (2008).** In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: implications for on-site disinfection for hospital infection control. *Water Res* 42: 73-80.
- Hunter PR (1993).** The microbiology of bottled natural mineral waters. *J Appl Bacteriol* 74: 345-352.

- J -

- Jakobi M, Winkelmann G, Kaiser D, Kempler C, Jung G, Berg G & Bahl H (1996).** Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J Antibiot (Tokyo)* 49: 1101-1104.
- Johnson EH, Al-Busaidy R & Hameed MS (2003).** An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50: 102-104.
- Jones RN, Sader HS & Beach ML (2003).** Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents* 22: 551-556.
- Juhasz AL & Naidu R (2000).** Enrichment and isolation of non-specific aromatic degraders from unique uncontaminated (plant and faecal material) sources and contaminated soils. *J Appl Microbiol* 89: 642-650.
- Juhasz AL, Stanley GA & Britz ML (2000).** Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Lett Appl Microbiol* 30: 396-401.

Juhnke ME & des Jardin E (1989). Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Appl Environ Microbiol* 55: 747-750.

Juhnke ME, Mathre DE & Sands DC (1987). Identification and Characterization of Rhizosphere-Competent Bacteria of Wheat. *Appl Environ Microbiol* 53: 2793-2799.

Jurkevitch E, Hadar Y & Chen Y (1992). Differential Siderophore Utilization and Iron Uptake by Soil and Rhizosphere Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58: 119-124.

- K -

Kapadia M, Rolston KV & Han XY (2007). Invasive *Streptomyces* infections: six cases and literature review. *Am J Clin Pathol* 127: 619-624.

Kaszab E, Kriszt B, Atzel B, Szabo G, Szabo I, Harkai P & Szoboszlay S (2009). The Occurrence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* on Hydrocarbon-Contaminated Sites. *Microb Ecol* 59: 37-45.

Kerr KG & Snelling AM (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 73: 338-344.

Kerr KG, Corps CM & Hawkey PM (1991). Infections due to *Xanthomonas maltophilia* in patients with hematologic malignancy. *Rev Infect Dis* 13: 762.

Kerr KG, Denton M, Todd N, Corps CM, Kumari P & Hawkey PM (1996). A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 607-610.

Khan NH, Ishii Y, Kimata-Kino N, Esaki H, Nishino T, Nishimura M & Kogure K (2007). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb Ecol* 53: 173-186.

Kiewitz C & Tummler B (2000). Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol* 182: 3125-3135.

Kim YM, Ahn CK, Woo SH, Jung GY & Park JM (2009). Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *J Biotechnol* 144: 293-298.

Kimata N, Nishino T, Suzuki S & Kogure K (2004). *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. *Microb Ecol* 47: 41-47.

Klockgether J, Reva O, Larbig K & Tummler B (2004). Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol* 186: 518-534.

Klockgether J, Wurdemann D, Wiehlmann L & Tummler B (2008). Transcript profiling of the *Pseudomonas aeruginosa* genomic islands PAGI-2 and pKLC102. *Microbiology* 154: 1599-1604.

Klockgether J, Wurdemann D, Reva O, Wiehlmann L & Tummler B (2007). Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 2443-2459.

Kodaka H, Iwata M, Yumoto S & Kashitani F (2003). Evaluation of a new agar medium containing cetrimide, kanamycin and nalidixic acid for isolation and enhancement of pigment production of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. *J Basic Microbiol* 43: 407-413.

Kohler T, Epp SF, Curty LK & Pechere JC (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181: 6300-6305.

Krsek M & Wellington EM (2001). Assessment of chitin decomposer diversity within an upland grassland. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79: 261-267.

Kuddus M & Ramteke PW (2009). Cold-active extracellular alkaline protease from an alkaliphilic *Stenotrophomonas maltophilia*: production of enzyme and its industrial applications. *Can J Microbiol* 55: 1294-1301.

Kumar RS, Ayyadurai N, Pandiaraja P, Reddy AV, Venkateswarlu Y, Prakash O & Sakthivel N (2005). Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J Appl Microbiol* 98: 145-154.

Kummerer K (2009). Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I. *Chemosphere* 75: 417-434.

Kumpiene J, Lagerkvist A & Maurice C (2008). Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments--a review. *Waste Manag* 28: 215-225.

- L -

Lambert PA (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 95 Suppl 41: 22-26.

Lambert RJ, Joynson J & Forbes B (2001). The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. *J Appl Microbiol* 91: 972-984.

Larbig KD, Christmann A, Johann A, et al. (2002). Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. *J Bacteriol* 184: 6665-6680.

Lasheras A, Guisset O, Boulestreau H, et al. (2006). [Reservoirs and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit]. *Med Mal Infect* 36: 99-104.

Latifi A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GS, Lazdunski A & Williams P (1995). Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 17: 333-343.

Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S & Cournoyer B (2007). Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J Microbiol Methods* 70: 20-29.

Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, et al. (2008). Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *J Appl Microbiol* 105: 1491-1501.

Ledbetter EC, Kim SG & Dubovi EJ (2009). Outbreak of ocular disease associated with naturally-acquired canine herpesvirus-1 infection in a closed domestic dog colony. *Vet Ophthalmol* 12: 242-247.

Lee DY, Shannon K & Beaudette LA (2006). Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J Microbiol Methods* 65: 453-467.

Lee JK, Lee YS, Park YK & Kim BS (2005). Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 25: 290-295.

Leitner G & Krifucks O (2007). *Pseudomonas aeruginosa* mastitis outbreaks in sheep and goat flocks: antibody production and vaccination in a mouse model. *Vet Immunol Immunopathol* 119: 198-203.

Lejon DP, Sebastia J, Lamy I, Chaussod R & Ranjard L (2007). Relationships between soil organic status and microbial community density and genetic structure in two agricultural soils submitted to various types of organic management. *Microb Ecol* 53: 650-663.

Lemunier M, Francou C, Rousseaux S, Houot S, Dantigny P, Piveteau P & Guzzo J (2005). Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. *Appl Environ Microbiol* 71: 5779-5786.

- Levings RS, Partridge SR, Djordjevic SP & Hall RM (2007).** SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 317-323.
- Levy SB & Marshall B (2004).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: S122-129.
- Li H, Toleman MA, Bennett PM, Jones RN & Walsh TR (2008).** Complete Sequence of p07-406, a 24,179-base-pair plasmid harboring the *bla*VIM-7 metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3099-3105.
- Li XZ, Zhang L & Poole K (2002).** SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 333-343.
- Li XZ, Zhang L, McKay GA & Poole K (2003).** Role of the acetyltransferase AAC(6)-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* 51: 803-811.
- Liang X, Pham XQ, Olson MV & Lory S (2001).** Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183: 843-853.
- Liaw SJ, Lee YL & Hsueh PR (2010).** Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucosyltransferase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 35: 126-130.
- Liebert CA, Hall RM & Summers AO (1999).** Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 507-522.
- Lighthart B (1979).** Enrichment of cadmium-mediated antibiotic-resistant bacteria in a Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) litter microcosm. *Appl Environ Microbiol* 37: 859-861.
- Liguori G, Cavallotti I, Arnese A, Amiranda C, Anastasi D & Angelillo IF (2010).** Microbiological quality of drinking water from dispensers in Italy. *BMC Microbiol* 10: 19.
- Lin CW, Chiou CS, Chang YC & Yang TC (2008).** Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Lett Appl Microbiol* 47: 393-398.
- Livermore DM (2001).** Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 47: 247-250.
- Livermore DM (2002).** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 34: 634-640.
- Livermore DM (2003).** Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 36: S11-23.
- Luo YR, Tian Y, Huang X, Yan CL, Hong HS, Lin GH & Zheng TL (2009).** Analysis of community structure of a microbial consortium capable of degrading benzo(a)pyrene by DGGE. *Mar Pollut Bull* 58: 1159-1163.
- Lynn WA & Golenbock DT (1992).** Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today* 13: 271-276.

- M -

- Mages IS, Frodl R, Bernard KA & Funke G (2008).** Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter*-like bacteria encountered in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 46: 2980-2986.
- Mao W, Warren MS, Lee A, Mistry A & Lomovskaya O (2001).** MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2001-2007.

- Marecik R, Kroliczak P, Czaczyk K, Bialas W, Olejnik A & Cyplik P (2008).** Atrazine degradation by aerobic microorganisms isolated from the rhizosphere of sweet flag (*Acorus calamus* L.). *Biodegradation* 19: 293-301.
- Marques AM, Congregado F & Simon-Pujol DM (1979).** Antibiotic and heavy metal resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. *J Appl Bacteriol* 47: 347-350.
- Martinez JL (2009).** Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157: 2893-2902.
- Martinez JL & Baquero F (2002).** Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 15: 647-679.
- Martinez JL, Sanchez MB, Martinez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A & Alvarez-Ortega C (2009).** Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 33: 430-449.
- Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martinez-Solano L & Sanchez MB (2009).** A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 33: 44-65.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H & Nishino T (2000).** Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2242-2246.
- Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, et al. (2008).** Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3100-3105.
- Matyar F, Kaya A & Dincer S (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci Total Environ* 407: 279-285.
- Matyar F, Akkan T, Ucak Y & Eraslan B (2009).** *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess*.
- Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G & Thomashow LS (2001).** Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183: 6454-6465.
- McGowan JE, Jr. (2006).** Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Infect Control* 34: S29-37; discussion S64-73.
- McManus AT, Mason AD, Jr., McManus WF & Pruitt BA, Jr. (1985).** Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a burn center. *Eur J Clin Microbiol* 4: 219-223.
- Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, et al. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 13: 560-578.
- Mewe M, Tielker D, Schonberg R, Schachner M, Jaeger KE & Schumacher U (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. *J Laryngol Otol* 119: 595-599.
- Miller DL, Radi ZA, Stiver SL & Thornhill TD (2004).** Cutaneous and pulmonary mycosis in green anacondas (*Eunectes murinus*). *J Zoo Wildl Med* 35: 557-561.
- Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, et al. (1997).** The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis* 24 Suppl 1: S46-62.
- Mindlin S, Kholodii G, Gorlenko Z, et al. (2001).** Mercury resistance transposons of gram-negative environmental bacteria and their classification. *Res Microbiol* 152: 811-822.
- Minkwitz A & Berg G (2001).** Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* 39: 139-145.

- Moore JE, Heaney N, Millar BC, Crowe M & Elborn JS (2002).** Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Commun Dis Public Health* 5: 23-26.
- Morales G, Wiehlmann L, Gudowius P, van Delden C, Tummler B, Martinez JL & Rojo F (2004).** Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping. *J Bacteriol* 186: 4228-4237.
- Morar P, Singh V, Makura Z, et al. (2002).** Oropharyngeal carriage and lower airway colonisation/infection in 45 tracheotomised children. *Thorax* 57: 1015-1020.
- Morihara K (1964).** Production of Elastase and Proteinase by *Pseudomonas Aeruginosa*. *J Bacteriol* 88: 745-757.
- Morita Y, Kimura N, Mima T, Mizushima T & Tsuchiya T (2001).** Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Gen Appl Microbiol* 47: 27-32.
- Moulton PJ, Vivian A, Hunter PJ & Taylor JD (1993).** Changes in cultivar-specificity toward pea can result from transfer of plasmid RP4 and other incompatibility group P1 replicons to *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. *J Gen Microbiol* 139: 3149-3155.
- Mouneimne H, Robert J, Jarlier V & Cambau E (1999).** Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 62-66.
- Muder RR (2007).** Optimizing therapy for *Stenotrophomonas maltophilia*. *Semin Respir Crit Care Med* 28: 672-677.
- Muder RR, Harris AP, Muller S, et al. (1996).** Bacteremia due to *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*: a prospective, multicenter study of 91 episodes. *Clin Infect Dis* 22: 508-512.
- Mushin R & Ziv G (1973).** An epidemiological study of *Pseudomonas aeruginosa* in cattle and other animals by pyocine typing. *J Hyg (Lond)* 71: 113-122.

- N -

- Nangia Y, Wangoo N, Goyal N, Shekhawat G & Suri CR (2009).** A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles. *Microb Cell Fact* 8: 39.
- Nascimento AM & Chartone-Souza E (2003).** Operon *mer*: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res* 2: 92-101.
- Nazaret S, Brothier E & Ranjard L (2003).** Shifts in diversity and microscale distribution of the adapted bacterial phenotypes due to Hg(II) spiking in soil. *Microb Ecol* 45: 259-269.
- Neuwirth C, Siebor E, Robin F & Bonnet R (2007).** First occurrence of an IMP metallo-beta-lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 4486-4488.
- Nicodemo AC & Paez JI (2007).** Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 229-237.
- Nies DH (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 730-750.
- Nordmann P & Guibert M (1998).** Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 42: 128-131.
- Nordmann P & Poirel L (2002).** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8: 321-331.
- Norman RS, Frontera-Suau R & Morris PJ (2002).** Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl Environ Microbiol* 68: 5096-5103.

- O -

- O'Toole GA & Kolter R (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295-304.
- Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R & Jung R (2005).** Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy* 25: 1353-1364.
- Okazaki A & Avison MB (2007).** Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 359-360.
- Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F & Blazquez J (2000).** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1254.
- Orsi GB, Mansi A, Tomao P, Chiarini F & Visca P (1994).** Lack of association between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital wards. *J Hosp Infect* 27: 49-60.
- Osborn AM, Bruce KD, Strike P & Ritchie DA (1997).** Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiol Rev* 19: 239-262.
- Osborne AD, Armstrong K, Catryse NH, Butler G & Versavel L (1981).** An outbreak of *Pseudomonas* mastitis in dairy cows. *Can Vet J* 22: 215-216.
- Oyetibo GO, Ilori MO, Adebuseye SA, Obayori OS & Amund OO (2009).** Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and antibiotics in Nigerian contaminated systems. *Environ Monit Assess* 168: 305-314.

- P -

- Pages D, Rose J, Conrod S, Cuine S, Carrier P, Heulin T & Achouak W (2008).** Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One* 3: e1539.
- Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S & Sa T (2005).** Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol Res* 160: 127-133.
- Pathmanathan A & Waterer GW (2005).** Significance of positive *Stenotrophomonas maltophilia* culture in acute respiratory tract infection. *Eur Respir J* 25: 911-914.
- Pell AN (1997).** Manure and microbes: public and animal health problem? *J Dairy Sci* 80: 2673-2681.
- Pellett S, Bigley DV & Grimes DJ (1983).** Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 45: 328-332.
- Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL & Kohler T (2004).** CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279: 8761-8768.
- Piccini C, Conde D, Alonso C, Sommaruga R & Pernthaler J (2006).** Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 72: 6560-6568.
- Pirnay JP, De Vos D, Mossialos D, Vanderkelen A, Cornelis P & Zizi M (2002).** Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol* 4: 872-882.
- Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, et al. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environ Microbiol* 4: 898-911.
- Pirnay JP, Matthijs S, Colak H, et al. (2005).** Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ Microbiol* 7: 969-980.

- Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, et al. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One* 4: e7740.
- Plotnikova JM, Rahme LG & Ausubel FM (2000).** Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in Arabidopsis. *Plant Physiol* 124: 1766-1774.
- Poole K (2004).** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 10: 12-26.
- Poole K (2005).** Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 479-487.
- Poole K & Srikumar R (2001).** Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem* 1: 59-71.
- Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, et al. (1996).** Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 21: 713-724.

- R -

- Radniecki TS, Semprini L & Dolan ME (2009).** Expression of *merA*, *trxA*, *amoA*, and *hao* in continuously cultured *Nitrosomonas europaea* cells exposed to cadmium sulfate additions. *Biotechnol Bioeng* 104: 1004-1011.
- Radniecki TS, Semprini L & Dolan ME (2009).** Expression of *merA*, *amoA* and *hao* in continuously cultured *Nitrosomonas europaea* cells exposed to zinc chloride additions. *Biotechnol Bioeng* 102: 546-553.
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG & Ausubel FM (1995).** Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-1902.
- Ramsey DM & Wozniak DJ (2005).** Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* 56: 309-322.
- Rasmussen LD & Sorensen SJ (1998).** The effect of longterm exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. *Curr Microbiol* 36: 291-297.
- Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B & Saiman L (2009).** Respiratory Microbiology of Patients With Cystic Fibrosis in the United States, 1995-2005. *Chest*.
- Read RC, Roberts P, Munro N, et al. (1992).** Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J Appl Physiol* 72: 2271-2277.
- Ready D, Pratten J, Mordan N, Watts E & Wilson M (2007).** The effect of amalgam exposure on mercury- and antibiotic-resistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 30: 34-39.
- Reid TM & Porter IA (1981).** An outbreak of otitis externa in competitive swimmers due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hyg (Lond)* 86: 357-362.
- Reuter S, Sigge A, Wiedeck H & Trautmann M (2002).** Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit Care Med* 30: 2222-2228.
- Ribbeck-Busch K, Roder A, Hasse D, de Boer W, Martinez JL, Hagemann M & Berg G (2005).** A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated *Stenotrophomonas rhizophila*. *Environ Microbiol* 7: 1853-1858.
- Richard P, Le Floch R, Chamoux C, Pannier M, Espaze E & Richet H (1994).** *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. *J Infect Dis* 170: 377-383.

- Riesenfeld CS, Goodman RM & Handelsman J (2004).** Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 6: 981-989.
- Ringen LM & Drake CH (1952).** A study of the incidence of *Pseudomonas aeruginosa* from various natural sources. *J Bacteriol* 64: 841-845.
- Roane TM & Kellogg ST (1996).** Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can J Microbiol* 42: 593-603.
- Rocco F, De Gregorio E, Colonna B & Di Nocera PP (2009).** *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: A start-up comparison. *Int J Med Microbiol*.
- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Mejean V & Foglino M (2000).** Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* 8: 498-504.
- Romanenko LA, Uchino M, Tanaka N, Frolova GM, Slinkina NN & Mikhailov VV (2008).** Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. *Arch Microbiol* 189: 337-344.
- Romano G, Stampi S, Zanetti F, De Luca G & Tonelli E (1997).** Occurrence of gram-negative bacteria in drinking water undergoing softening treatment. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 200: 152-162.
- Romling U, Wingender J, Muller H & Tummler B (1994).** A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol* 60: 1734-1738.
- Romling U, Kader A, Sriramulu DD, Simm R & Kronvall G (2005).** Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients. *Environ Microbiol* 7: 1029-1038.
- Roy PH, Tetu SG, Larouche A, et al. (2010).** Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One* 5: e8842.
- Roy U & Nair D (2007).** Biodiversity of organotin resistant *Pseudomonas* from west coast of India. *Ecotoxicology* 16: 253-261.
- Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N & Vinas M (2004).** Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Arch Med Res* 35: 251-257.
- Ryan RP, Fouhy Y, Garcia BF, et al. (2008).** Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 68: 75-86.
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, et al. (2009).** The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7: 514-525.
- Ryder C, Byrd M & Wozniak DJ (2007).** Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 10: 644-648.

- S -

- Sagardia F, Rigau JJ, Martinez-Lahoz A, Fuentes F, Lopez C & Flores W (1975).** Degradation of benzothiophene and related compounds by a soil *Pseudomonas* in an oil-aqueous environment. *Appl Microbiol* 29: 722-725.
- Sanchez MB & Martinez JL (2009).** SmQnr contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 580-581.
- Sanchez MB, Hernandez A & Martinez JL (2009).** *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiol* 4: 655-660.
- Sanchez MB, Hernandez A, Rodriguez-Martinez JM, Martinez-Martinez L & Martinez JL (2008).** Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates

Stenotrophomonas maltophilia as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol* 8: 148.

Sanchez P, Alonso A & Martinez JL (2004). Regulatory regions of *smeDEF* in *Stenotrophomonas maltophilia* strains expressing different amounts of the multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2274-2276.

Sato H & Frank DW (2004). ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol* 53: 1279-1290.

Schalk IJ, Abdallah MA & Pattus F (2002). A new mechanism for membrane iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Soc Trans* 30: 702-705.

Schaumann R, Stein K, Eckhardt C, Ackermann G & Rodloff AC (2001). Infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*--a prospective study. *Infection* 29: 205-208.

Schluter A, Heuer H, Szczepanowski R, Forney LJ, Thomas CM, Puhler A & Top EM (2003). The 64 508 bp IncP-1beta antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1beta group. *Microbiology* 149: 3139-3153.

Schreiber L, Krimm U, Knoll D, Sayed M, Auling G & Kroppenstedt RM (2005). Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol* 166: 589-594.

Schwartz T, Volkmann H, Kirchen S, Kohnen W, Schon-Holz K, Jansen B & Obst U (2006). Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 158-167.

Senol E, DesJardin J, Stark PC, Barefoot L & Snyderman DR (2002). Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Clin Infect Dis* 34: 1653-1656.

Silver S & Phung le T (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 587-605.

Slama TG (2008). Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care* 12 Suppl 4: S4.

Smith JM, Smith NH, O'Rourke M & Spratt BG (1993). How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4384-4388.

Solomon EB, Yaron S & Matthews KR (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl Environ Microbiol* 68: 397-400.

Spencer DH, Kas A, Smith EE, et al. (2003). Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185: 1316-1325.

Starkey M & Rahme LG (2009). Modeling *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts. *Nat Protoc* 4: 117-124.

Steele CM, Brown RN & Botzler RG (2005). Prevalences of zoonotic bacteria among seabirds in rehabilitation centers along the Pacific Coast of California and Washington, USA. *J Wildl Dis* 41: 735-744.

Stepanuskas R, Glenn TC, Jagoe CH, Tuckfield RC, Lindell AH & McArthur JV (2005). Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ Sci Technol* 39: 3671-3678.

Stojek NM & Dutkiewicz J (2004). Studies on the occurrence of Gram-negative bacteria in ticks: *Ixodes ricinus* as a potential vector of *Pasteurella*. *Ann Agric Environ Med* 11: 319-322.

Stoodley BJ & Thom BT (1970). Observations on the intestinal carriage of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 3: 367-375.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.

Strateva T & Yordanov D (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 58: 1133-1148.

Suckstorff I & Berg G (2003). Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *J Appl Microbiol* 95: 656-663.

Summers AO, Wireman J, Vimy MJ, et al. (1993). Mercury released from dental "silver" fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 825-834.

- T -

Taghavi S, Garafola C, Monchy S, et al. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75: 748-757.

Teitzel GM, Geddie A, De Long SK, Kirisits MJ, Whiteley M & Parsek MR (2006). Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188: 7242-7256.

Telford G, Wheeler D, Williams P, et al. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 66: 36-42.

Tenover FC, Arbeit R, Archer G, et al. (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 32: 407-415.

Thioulouse J & Lobry JR (1995). Co-inertia analysis of amino-acid physico-chemical properties and protein composition with the ADE package. *Comput Appl Biosci* 11: 321-329.

Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmoniere P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC & Regnier B (2003). Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 53: 274-282.

Tielker D, Hacker S, Loris R, et al. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151: 1313-1323.

Toder DS, Ferrell SJ, Nezezon JL, Rust L & Iglewski BH (1994). *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infect Immun* 62: 1320-1327.

Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN & Walsh TR (2007). Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. *Emerg Infect Dis* 13: 559-565.

Trautmann M, Lepper PM & Haller M (2005). Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 33: S41-49.

- V -

Vakulenko SB & Mobashery S (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 16: 430-450.

Valdezate S, Vindel A, Martin-Davila P, Del Saz BS, Baquero F & Canton R (2004). High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. *J Clin Microbiol* 42: 693-699.

Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A & Filloux A (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6911-6916.

- Vallini G, Di Gregorio S & Lampis S (2005).** Rhizosphere-induced selenium precipitation for possible applications in phytoremediation of se polluted effluents. *Z Naturforsch C* 60: 349-356.
- Van Asperen IA, de Rover CM, Schijven JF, et al. (1995).** Risk of otitis externa after swimming in recreational fresh water lakes containing *Pseudomonas aeruginosa*. *BMJ* 311: 1407-1410.
- Van Houdt R, Monchy S, Leys N & Mergeay M (2009).** New mobile genetic elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34, their possible roles and occurrence in other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96: 205-226.
- Veber B (2003).** [Unusual clinical aspects of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*]. *Ann Fr Anesth Reanim* 22: 539-543.
- Veesenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T & Rello J (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med* 37: 1777-1786.
- Vezina G & Levesque RC (1991).** Molecular characterization of the class II multiresistance transposable element Tn1403 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 313-321.
- Villarino ME, Stevens LE, Schable B, Mayers G, Miller JM, Burke JP & Jarvis WR (1992).** Risk factors for epidemic *Xanthomonas maltophilia* infection/colonization in intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 13: 201-206.

- W -

- Wagner VE & Iglewski BH (2008).** *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 35: 124-134.
- Walker TS, Bais HP, Deziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R & Vivanco JM (2004).** *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol* 134: 320-331.
- Wall D & Kaiser D (1999).** Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* 32: 1-10.
- Walsh TR (2005).** The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 11 Suppl 6: 2-9.
- Walsh TR, MacGowan AP & Bennett PM (1997).** Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1460-1464.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L & Nordmann P (2005).** Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18: 306-325.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM & Bhole BD (2001).** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176: 386-390.
- Weldhagen GF, Poirel L & Nordmann P (2003).** Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2385-2392.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC & Mattick JS (2002).** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295: 1487.
- Wideman WL (2006).** *Pseudomonas aeruginosa* otitis media and interna in a chinchilla ranch. *Can Vet J* 47: 799-800.
- Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, et al. (2007).** Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8101-8106.
- Wilkinson FH & Kerr KG (1998).** Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *Eur J Cancer Care (Engl)* 7: 12-14.

Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, Genov N, Buck F, Borowski P & Weber W (2002). The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. *J Biol Chem* 277: 11042-11049.

Winstanley C, Langille MG, Fothergill JL, et al. (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 19: 12-23.

Winther L, Andersen RM, Baptiste KE, Aalbaek B & Guardabassi L (2009). Association of *Stenotrophomonas maltophilia* infection with lower airway disease in the horse: A retrospective case series. *Vet J*.

Wireman J, Liebert CA, Smith T & Summers AO (1997). Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates. *Appl Environ Microbiol* 63: 4494-4503.

Wright C, Kominos SD & Yee RB (1976). *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. *Appl Environ Microbiol* 31: 453-454.

Wright GD (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 5: 175-186.

Wright MS, Loeffler Peltier G, Stepanauskas R & McArthur JV (2006). Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiol Ecol* 58: 293-302.

- Y -

Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M & Tolker-Nielsen T (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153: 1318-1328.

Yoshpe-Purer Y & Golderman S (1987). Occurrence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Israeli coastal water. *Appl Environ Microbiol* 53: 1138-1141.

- Z -

Zechman JM & Casida LE, Jr. (1982). Death of *Pseudomonas aeruginosa* in soil. *Can J Microbiol* 28: 788-794.

Zhang Z, Yuen GY, Sarath G & Penheiter AR (2001). Chitinases from the Plant Disease Biocontrol Agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology* 91: 204-211.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Séquences des déterminants *merA* mis en évidence chez *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*.

>APA PROFILE POE22 MERA

TTCGATGGCGGTATTGCGGCAACTGTGCCTACGATTGACCGCAGTAAGCTGCTGGCCCAGCAGCAGGCCCGCGTC
GACGAACTGCGGCACGCCAAGTACGAAGGCATCCTGGGCGGTAATCCGGCCATCACCGTTGTGCACGGTGAGGCG
CGCTTCAAGGACGACCAGAGCCTTACCGTCCGTTTGAACGAGGGTGGCGAGCGCGTCTGTGATGTTGACCGCTGC
CTGGTCGCCACGGGTGCCAGCCCGGCGGTCCC GCCGATTCCGGGCTTGAAAGAGTCACCCCTACTGGACTTCCACC
GAGGCCCTGGCGAGCGACACCATTCCCGAACGCCTTGCCGTAATCGGCTCGTTCGGTGGTGGCGCTGGAGCTGGCG
CAAGCCTTTGCCCGGCTGGGCAGCAAGGTACGGTCTGCGCGCAATACCTTGTCTTCCGTGAAGACCCGGCC
ATCGGCGAGGCGGTGACAGCCGCTTTCCGTGCCGAGGGCATCGAGGTGCTGGAGCACACGCAAGCCAGCCAGGTG
GCCCATATGGACGGTGAATTCGTGCTGACCACCACGCACGGTGAATTCGCGCGCCGACAACTGCTGGTTGCCACC
GGTCGGACACCGAACACGCGCAGCCTCGCGCTGGACGCAGCGGGGGTCACTGTCAATGCGCAAGGTGCCATCGTC
ATCGACCAAGGCATGCGCACGAGCAACCCGAACATCTACGCGGCCGGCGACTGCACCGACCAGCCGAGTTTCGT
TATGTGGCGGCAGCGGCCGGCACCCGTGCCGCGATCAACATGACCGGCGGCGATGCGGCGCTCGA

>BPA PROFILE POE19 MERA

GTTTCGACGGCGGCATCCTGGCGACTGTGCCTGCGGTTGACCGCAGCAAATTA CTGGCCAACAGCAGGCACGCGT
CGATGAGCTGCGCCACGCCAAGTACGAAGGCATCCTGGACGGCAACCCGGCCATCACCGTCTGCACGGCGAAGC
GCGTTTTCAAGGACGACCAGAGCCTTGCCGTCCGTTTGAACGATGGCGGGGAGCGCGTCTGTGATGTTGACCGCTG
CCTGGTCGCCACGGGTGCCAGTCCGGCCGTGCCGCCGATTCCAGGCTTGAAAGAGTCCCCCTACTGGACTTCGAC
CGAGGCCCTGGTCAGCGACACCATTCCCGAGCGCCTAGCCGTGATCGGCTCGTTCGGTGGTGGCGCTGGA ACTGGC
GCAAGCATTGCCCCGGCTGGGCAGCCAGGTACGATCCTGGCGCGCAGCACCTTGTCTTCCGCGAAGACCCCTGC
CATCGGCGAGGCTGTACAGCCGCCTTCCGTGCCGAAGGGATCACGGTGTGGAAACACACGCAAGCCAGCCAGGT
CGCGCATGTGGACGGTGAATTCGTGCTGACCACCGCAGCGAGAATTGCGCGCCGACAAGCTGCTGGTTCGCTAC
CGGGCGGACACCGAACACGCGCAGCCTGGCACTGGACGCAGCGGGAGTCAACCGTCAATGCACAAGGTGCCATCGC
CATCGACAAGGGCATGCGCACAGCAGCAGCCGCACATTTATGCGGCCGGCGACTGCACTGACCAACCGCAATTCGT
CTATGTGGCGGCAGCCGCCGGCACCCGCGCCGCGATCAACATGACGGGCGGGGATGCTGCCATCAA

>CPA PROFILE POE103 MERA

GTTTTGATGGCGGACTGCCCGCCACGCCCGCGCTTGTCTTGC GCGAACGGTTGCTCGCCCAGCAACAGGGTTCGTGT
CGACGAACTGCGCCACGCCAAGTACGAAGGCATTCCTGGAAAGCACCCCAGCCATCACCGTGTGCGTGGCTCCGC
CCGCTTCCAGGACAGCCACACGCTCAGTGTGAACTGGTCGAGGGGGGCGAGCGCATCGTGACCTTCGACCGCTG
CCTGATTGCCACCGGCGCCAGTGC GGCCGTGCCGCCGATTCCCGGACTGCAAGATAACCCCTTTTGGAACTCGGA
AAAGGCGCTGGCAAGCAGCAGTATTCCGCAACGGCTCGCCGTGATCGGCTCATCCGTGGTGGCTTGGAGCTGGC
GCAAGCCTTTGCCCGGCTGGGTAGCCGCGTACCATCCTGGCGCGCAACTCGCTGTTCTTCCGTGAAGATCCGGC
CATCGGCGCAGCGCTGACGGCGGCCTTCCGCTGGAGGGCATCGAAGTGTGGAACAGACGCAAGCCAGCCAGGT
GGCCCATGCCAACGGCGAGTTTCGTGCTGACCACCAAGCACGGTGAAGTGC GGGTCGACCAACTGCTCGTCCGAC
CGGACGCACGCCAACACCCACGGCCTGAACCTGGAAGCGGCCGGCGTGCAGCTGGATGAACCGGTTGCCATCCA
GATCGACCAGGGCATGCGCAGCAGCAAAGCGGATATTTATGCGGCCGGCGACTGCACCAACCAGCCGAGTTTCGT
CTATGTGCGGGCGGCGGCCGGCAATCGCGCGGCGATCAACATGACCGGCGGCGAGGCAAT

>DPA PROFILE ATCC31479 MERA

TTCGATGCTGGCCTGCCGGCCGAGCGCCCGCTGTACTGCGCGAGCGGCTGCTGGCCCAGCAACAAGGCCGCGTC
GAGGAGCTGCGCCATGCCAAGTACGAAGGCATCCTGGCAAGCACTCCGGCCATCACCGTGTGCGCGGCGAGGCC
CGGTTTCAGGGACACGCGCACGCTGACCGTGGCGACCGCTGACGGCGGCACGCACGAGGTGAACTTCGACCGCTGC
CTGATTGCCACCGGCGCGAGCCCGGCGCTTCCGCCAATCCCGGGCCTTGCGGACACACCCCACTGGACCTCCACC
GAGGCGCTGGAAGCAGCTCGCTCCCCGAGCGGCTGGCCGTGATTGGTTCTTCCGTGGTGGCGGTCGAGTTGGCG
CAAGCCTTCGCCCGGCTGGGCAGCCAGTACGATCCTGGCGCGCAGCAGCAGTGTCTTCCGAGAAGACCCGGCC
ATCGGGGAAGCCGTAACAGACGCCTTCCGCGCCGAGGGCATCGAGGTGCTGGACCACACCCAGCCGAGCCAGTT
GCCTATGCGGGCGGGGAATTCGTGCTCACCACCGGGCAGGGGGAAGTGC GCGCCGACAAGCTGCTGGTCCGCCACC
GGTCGCGCGCCGAACACGCGCAGCCTGAACCTTGAAGCGGCAGGCGTCGAAGTCAATGCGCAGGGAGCCATCGTC
ATCGACCGCGCCATGCGCACGAGCGCACCGCACATCTTTGCTGCCGGCGACTGCACCGACCAGCCGAGTTTCGT
TATGTGGCGGCGGCGGCCGGCACGCGCGCCGCGATCAACATGACCGGCGGCGACGCGGCGCT

>EPA PROFILE DB3046 MERA

TCGACGCCGGGCTGTTCGGCCACCACGCCGGCCGTCTTGC GCGAACGGCTGCTCGCGCAACAACAAGGTCGCGTGG
ACGAACTGCGTCATGCCAAGTACGAAAACATCCTGGAGGGCAGCCGGCCATCAGCGTGTGCGCGGCAGCGCCC
GTTTTAGCGATGGCCGCACGCTCAGCGTGGAAGTGGCAGGCGGGCGAGCGCATCCTTTGCCCTTCGACCGCTGCC
TGTTTGCCACCGGCGCGAGTCCGGCCATTCCGCGGATTCCCGGCCTCCAGGGCAGCCCTACTGGACCTCTACCG
AGGCGCTGGTGTAGCGACAGCATTCCCAAACGCTTGACGGTGATCGGATCCTCGGTGGTAGCGCTGGAAGTGGCGC
AGGCCTTCGCCCGCTTGGGTAGCAAGGTGACGATTCTGGCGCGCCACACGCTGTTCTTCCGTGAAGACCCGGCCA
TCGGCGAAGCGCTGACGGCGGCCTTCCGGATGGAGGGCATCGAAGTGTGGAGCAGACGCAAGCCAGCCAGGTGT
CCTACGCCAACGGCGAGTTTCGTGTGACCAACACGGCGAAGTGC GCGCCGACCAACTGCTCGTCGCCACCG
GCCGACGCCAACACCCAGGGCATGAACCTAGAAGCAGCCGGCGTGCAGCTGGACGAACGCGGGCGCATCCGGA
TCGACTCCGGCATGCGCAGCAGCGCCCCGATATCTATGCGGCCGGCGATTGCACCGACCCGCAATTCGTCT
ATGTCGCCCGGGCCCGGCACCCGCGGGCGATCAACATGACCGGGCGGGAGGC

>FPA PROFILE 373 MERA

CGTTTCGATGGCGGCATCGCCGCTACCACGCCGACCATCCAGCGCACGGCGCTGCTGGCCCAGCAGCAGGCCCGCG
TCGATGAACTGCGCCACGCCAAGTACGAAGGCATCCTTGGAGGGCAATCCGGCGATCACTGTGCTGCACGGCTCCG
CCCGCTTTAAGGACAATCGCAACCTGATCGTGCAACTCAACGACGGCGGGCAGCGCGTGGTGGCATTTCGACCGCT
GCCTGATCGCCACCGGCGCGAGCCCGGCCGTGCCGCCGATTCCCGGCCTGAAAGACACTCCGTAAGTGGACTTCCA
CTGAAGCGCTGGTGTAGCGAGACGATTCTAAGCGCCTGGCCGTGATTGGCTCATCAGTGGTGGCGCTGGAGCTGG
CGCAGGCGTTTCGCCGACTCGGAGCGAAGGTGACGATCCTGGCTCGCAGCAGCGTGTCTTCCGCGAAGACCCAG
CTATAGGCGAAGCCGTACGGCCGCATTCGCGATGGAGGGCATCGAGGTGAGGGAACACACCCAGGCCAGCCAGG
TCGCGTATATCAATGGTGAAGGGGACGGCGAATTCGTGCTCACACGGCGCACGGCGAAGTGC GCGCCGACAAGC
TGCTGGTGCACCAGGGCCGCGGCCAACACACGCAAGCTGGCACTGGATGCGACGGGCGTACGCTCACCCCGC
AAGGCGCTATCGTCATCGACCCCGCATGCGTACAAGCGTGGAAACATCTACGCCGAGGGCGACTGCACCGACC
AGCCGCAGTTTCGTCTATGTGGCGGCAGCGGCCGGCACTCGCGCCGCGATCAACATGACCGGGCGGTGACCGGGCC
TG

>GPA PROFILE 186 MERA

GTTCGACGCCGGGCTTTCCGCCATGACGCCGACCGTCTACGCGAACGTCTGCTCGCGCAGCAACAAGACCGTGT
CGCCGAACTGCGCCACGCCAAGTACGAAAGCATCCTGGAGAGCAGCCGGCGATCAGCGTGTGCGCGGCACCCG
CCGTTTTCCAGGACGGCCACACGCTCAGCGTGAAACTGGCCGAGGGTGGCGAGCACATCGTAGCCTTCGACCGCTG
CCTGGTTCGCCACCGGCGAAGCGCGGCCGCTTCCACCGATTCCAGGACTGAAAGACACGCCGTAAGTGGACTCAGA
CCAGGCACTGGCGAGCGATAACAATCCCTAAGCGGCTCGCCGTGATCGGCGCCTCCGTAGTGGCAGTGGAACTGGC
GCAGGCCTTTCGCCCGGCTGGGTAGCGAGGTACGATCCTGGCACGCAAGTGC GATGTTCTTCCGCAAGACCCGGC
CATCGGCGCGGGGTGACGGAGGCCTTCCGTATGGAGGGCATCGAAGTGTGGAGCAAACCAAGCCAGCCAGGT
GTCCACGCCAACGGCGAGTTTCGTACTGGCCACCAACCATGGTGAGTTACGTGCCGACCAACTGCTCGTCGCCAC
CGGCCGACGCCAATACCCAGGGCCTGAACTGGAAGCGGCCGACGTGCAGCTGGACGAGCGGGCGGCATCCA
GATCGACGAGCGCATGCGCACAGCGCAGCGGATATCTATGCGGCCGGCGACTGCACCGACCAACCCGAGTTTCGT
CTACGTGCGGCAGCGGCTGGCACCCGCGGGCAATCAACATGACCGGGCGGGAGGCAGCAGCTCAA

>HPA PROFILE LMG9009 MERA

GTTCGACGGCGGTATTGCGGCAACTGTGCCTGCGATTGACCGCAGCAAAGTGTGGCCAGCAGCAGGCCCGTGT
CGATGAACTGCGGCACGCCAATAACGAAGGCATCCTGGACGGCAATCCAGCCATCACCGTTTTGCACGGTGAAGC
GCGTTTTCAAGGACGACCAGAGCCTGGTTCGTCCGTTTTGAACGAGGGTGGCGAGCGGAGGTAACGTTTCGACCGCTG
CCTGGTTCGCCACCGGTGCCAGTCCGGCCGTGCCGCCGATTCCGGGCCTGAAAGAGTCAACCTACTGGACTTCCAC
CGAAGCGCTTGTGACGACACCATTCGCCGACGCCTGGCCGTGATCGGTTTCGTTCGGTGGTGGCGTTGGAAGTGGC
GCAAGCCTTTGCCCGGCTCGGCAGCCAGGTACGATCCTGGCACGCAGCACCTTGTCTTCCGGGAAGACCCGGC
CATCGGCGAGGCCGTGACAGCCGCTTTCCGCGCCGAGGGCATCGAGGTGCTGGAGCACACGCAAGCCAGCCAGGT
CGCCCATGTGAACGGCGAATTCGTGCTGACCACCGGACACGGTGAATTCGCGCTGACAAGTTGCTGGTTGCCAC
CGGTTCGGGCACCGAATACGCGCAGCCTCGCGCTGGACGCGGGGGGTTCACTGTCAATGCGCAAGGGGGCCATCGT
TATCGACCAAGGCATGCGCACGAGCAACCCGAACATCTACCGGCCGGCGACTGCACCGACCCAGCCGAGTTTCGT
CTACGTGGCAGCGGCCCGCCGGCACCCGTCGCCGATCAACATGACCGGGCGGGAGGCAGCAGCCCTC

>IPA PROFILE PA6 MERA2

TAGTCATTTTGTATACTACGCGCATCTGCGCGGGAGCAATTCGATGGCGGATGGCCCCACTGGGCGACATCTGGC
CCGAGCGGCTGCGGCCAGCAGCGGCCCGTGTGCAAGAAGTCCGTCATGCCAAGTACGAAAGGCTCCTGGACGGG
AATTCGGCCCTTCCGTTCTGACGGGGAAGCGCGGTTTCAGGACAACAACAACTTTTCGTTAGTTTGAACGAA
GGGGGGGAGCGCGTTCGTGGTGTTCGACCGCTGCCTGGTTCGCCACGGGTGCCAGTCCGGCCATGCCCGGATTCG
GGCTTGAAGAGTCAACCTACTGGACTTCCACCGAGGCCTTGGTTCAGCGACACCATTCGCCGAACGCTGGCCGTC
ATCGGCTCGTTCGGTGGTGGCGCTGGAAGTGGCGCAAGCCTTCGCCCGGCTGGGTAGCCAGGTACGATCCTGGCG
CGCAATACGTTGTTCTTCCGCGAAGACCCTGCCATCGGCGAGGCCGTACAGCCGCTTCCGTGCCGAAGGAATC
AAGGTACTGAAACATACGCAAGCCAGCCAAGTGC GCCATGTGGACGGCGAATTCGTGCTGACCACTGCACACGGC

GAAGTGC GCGCCGACAAACTGCTGGTTCGCCACCGGTTCGGACACCGAACACGCGCAGCCTGGCATTGGACGCAGCG
GGGGTAGCTGTCAATGCGCAGGGTGCATCGTTCATCGACCAGGGCATGCGCACGAGCAGCCCCGAACATCTACGCG
GCCGGCGACTGCACCGACCAGCCGAGTTTCGTCTATGTGGCGGCAGCGGCCGGCCACTCGTGCCGCCATCAACATG
ACCGGCGGCGACGCCGCCATCAATCTGACCGCGATGCCGGCCGTGGTGTTCACCGATCCGCAAGTGGAACTGGT
AGCGCTAACA

>ASM PROFILE 478 S.M MERA

GTTTCGATGGCGGTATTGCGGCAACTGTGCCTACGATTGACCGCAGTAAGCTGCTGGCCCAGCAGCAGGCCCGCGT
CGACGAACTGCGGCACGCCAAGTACGAAGGCATCCTGGGCGGTAATCCGGCCATCACCGTTGTGCACGGTGAGGC
GCGCTTCAAGGACGACCAGAGCCTTACCGTCCGTTTGAACGAGGGTGGCGAGCGCGTTCGTGATGTTTCGACCGCTG
CCTGGTTCGCCACGGGTGCCAGCCCCGGCGGTTCCCGCGATTCCGGGCTTGAAAGAGTCAACCTACTGGACTTCCAC
CGAGGCCCTGGCGAGCGACACCATTTCCCGAACGCGCTTCCCGTAATCCGGTTCGTCGGTGGTGGCGCTGGAGCTGGC
GCAAGCCTTTGCCCGGCTGGGCAGCAAGGTACGGTTCCTGGCGCGCAATACCTTGTTCCTCCGTGAAGACCCGGC
CATCGGCGAGGCGGTGACAGCCGCTTTCCGTGCCGAGGGCATCGAGGTGCTGGAGCACACGCAAGCCAGCCAGGT
CGCCCATATGGACGGTGAATTCGTGCTGACCACCACGCACGGTGAATTGCGCGCCGACAACTGCTGGTTGCCAC
CGGTTCGGACACCGAACACGCGCAGCCTCGCGCTGGACGCAGCGGGGCTCACTGTCAATGCGCAAGGTGCCATCGT
CATCGACCAAGGCATGCGCACGAGCAACCCGAACATCTACGCGGCCGGCGACTGCACCGACCAGCCGAGTTCGT
CTATGTGGCGGCAGCGGCCGGCACCCGTGCCGCGATCAACATGACCGGCGGCGATGCGGCGCTCG

>DSM PROFILE 979 S.M MERA

GTTTCGATGCTGGCCTGCCGGCCGACGCGCCCGCTGTACTGCGCGAGCGGCTGCTGGCCCAGCAACAAGGCCGCGT
CGAGGAGCTGCGCCATGCCAAGTACGAAGGCATCCTGGCAAGCACTCCGGCCATCACCGTGTGCGCGGCGAGGC
CCGGTTCAGGGACACGCGCACGCTGACCGTGGCGACCGCTGACGGCGGCACGCACGAGGTGAACTTCGACCGCTG
CCTGATTGCCACCGGCGCGAGCCCCGGCGCTTCCGCCAATCCCGGGCCTTGCGGACACACCCCACTGGACTTCCAC
CGAGGCGCTGGAAAGCAGCTCGCTCCCCGAGCGGCTGGCCGTGATTGGTTCTCCGTGGTGGCGGTCGAGTTGGC
GCAAGCCTTCCCGCGGCTGGGCAGCCAGGTACGATCCTGGCGCGCAGCACGCTGTTCTTCCGAGAAGACCCGGC
CATCGGGGAAGCCGTAACAGACGCCTTCCCGCGCCGAGGGCATCGAGGTGCTGGACCACACCCAGGCGAGCCACGT
TGCCTATGCGGGCGGGGAATTCGTGCTCACCACCGGGCAGGGGGAAGTGC GCGCCGACAAGCTGCTGGTCGCCAC
CGGTTCGCGCGCCGAACACGCGCAGCCTGAACCTTGAAGCGGCAGGCGTCAAGTCAATGCGCAGGGAGCCATCGT
CATCGACCGCGCCATGCGCACGAGCGCACCCGCACATCTTGTGCGCGGCGACTGCACCGACCAGCCGAGTTCGT
CTATGTGGCGGCGGCGGCCGGCACGCGCGCCGCGATCAACATGACCGGCGGCGACGCGGCGCTGG

>JSM PROFILE L2920 MERA

TGCGGCGGGAAAGTCCGTTTCGATGGCGGTATTGCCGCCCGCGCGCCGGCGATCCTGCGCGAGCGTTTGTGCGCG
AGCAGCAGGCGCGCGTTCGATGAACTGCGCCAGGCCAAGTACGAGGGGATTCTGGACAGCACCCCGGCCATTACCG
TGCTGCGCGGCGAAGCCCGCTTCCAGGACAGGCACACCCTGAAGGTACAACCTCGGCGACGGTTCGCGAGCGCGTGG
TCGCGTTTCGACCGCTGCCTGATCGCCACCGGCGCGAGTCCCGCGCTTCCACCGATCCCCGGCTTGAAGACACCC
CCTACTGGACCTCGACCGAAGCACTGGCCAGCGACACGATCCCGCCGCGCCTGGCGGTCATCGGCTCGTTCGGTGG
TCGCGGTTCGAGTTGGCGCAGGCCTTTGCCCGGCTGGGCAGCCGGGTACGATCCTGGCGCGCAGTACGCTGTTCT
TCCGCGAAGACCCTGCCATCGGCGAAGCCGTGACGGCTGCGTTCCGCGCGGAGGGCATCGAGGTACTGGAGCATA
CCCAGGCGAGCCAGGTTCGTCTACACCGAGGGCGCGTTCGTGCTGACCACGGCACACGGCGAGTTGCGCGCCGACC
GGTTGCTGGTTCGCCACCGGCCGACCCCGAATACCCGCGGCTGAATCTCGAAGCGGCAGGCGTTCGAGCTCAATG
GGCAAGGAGCCATCATCATCGACCGCGCGATGCGTACCTCTGCGCCTCACCTCTACGCCCGCGGCGACTGCACCG
ACCAGCCGAGTTTCGTGTACGTTGCCGCGGCGGCCGGGACCCGCGCCGCGATCAACATGACCGGCGGCGATGCGG
CGCTGGACCTGACGGC

ANNEXE 2 : Séquence du déterminant *bla_{IMP}* mis en évidence dans le sol 14 du site de Pierrelaye.

>BLA-IMP P14-1

GGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCCATTCCCACACATGCATCTGAATTAACAAATGAACT
TCTTAAAAAGGACGGTAAGGTGCAAGCTAAAAACTCATTTAGCGGAGTCAGTTATTGGCTAG
TTAAAAATAAAATTGAAGTTTTTTATCCCGGCCCGGGGCACACTCAAGATAACGTAGTGGTT
TGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGTTTTGTTAAACCGGATGGTCTTGGTAA
TTTGGGGGACGCAAATTTAGAAGCTTGGCCAAAGTCCGCCAAAATATTAATGTCTAAATATG
GTAAAGCAAACACTGGTTGTTTCAAGTCATAGTGAAATTGGGGACGCATCAC