



# Milieux urbains et exposition aux Actinobactéries pathogènes : cas particulier des bassins d'infiltration

Florian Vautrin

## ► To cite this version:

Florian Vautrin. Milieux urbains et exposition aux Actinobactéries pathogènes : cas particulier des bassins d'infiltration. Ecologie, Environnement. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1300 . tel-02546498

**HAL Id: tel-02546498**

**<https://theses.hal.science/tel-02546498>**

Submitted on 18 Apr 2020

**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.



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1300

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale ED341**  
**Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation**

**Spécialité de doctorat** : Ecologie Microbienne

**Discipline** : Biologie

Soutenue publiquement le 12/12/2019, par :

**Florian VAUTRIN**

---

# **Milieus urbains et exposition aux Actinobactéries pathogènes : cas particulier des bassins d'infiltration**

---

Devant le jury composé de :

MARCHANDIN, Hélène	PU-PH – Université de Montpellier	Rapporteur
MOULIN, Laurent	Directeur R&D – Université Paris Est-Créteil	Rapporteur
JARRAUD, Sophie	PU-PH – Université de Lyon	Examinatrice
LEBEAUX, David	MCU-PH – Université Paris Descartes	Examineur
MERMILLOD-BLONDIN, Florian	Chargé de Recherche, Université de Lyon	Invité

RODRIGUEZ-NAVA, Verónica	Professeur, Université de Lyon	Directrice de thèse
WINIARSKI, Thierry	Directeur de Recherche, ENTPE	Co-directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

## **M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –

Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en

Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G. RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C.

VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M.

SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE





## REMERCIEMENTS

Que le temps passe vite ! Mais je vais tout de même en prendre un peu pour remercier toutes les personnes sans qui cette aventure n'aurait pas été possible.

Tout d'abord, je tenais à remercier les mêmes du jury, Sophie Jarraud, David Lebeaux, Hélène Marchandin, Florian Mermillod-Blondin et Laurent Moulin d'avoir pris du temps pour moi et accepté d'évaluer ces travaux de thèse.

Merci également aux membres de mon comité de suivi dont ces deux rencontres ont été très enrichissantes et ont permis de bien cadrer cette aventure. Merci donc à Sylvie Barraud, Benoît Cournoyer, Laurent Lassabatère et Petar Pujic pour vos conseils avisés. Petar, merci également pour tes conseils/connaissances sur la génomique de *Nocardia*.

Un grand merci également à mes deux encadrants de thèse : Thierry, je tenais à m'excuser d'avoir été un fantôme, mais nos rencontres ont toujours été très enrichissantes, tes conseils avisés et ta facilité déconcertante à simplifier des questions pourtant complexes m'ont été d'une grande aide. Verónica, par où commencer ? Déjà, merci de m'avoir pris sous ton aile sans vraiment me connaître, de m'avoir fait confiance pour cette thèse. Merci pour ta bonne humeur, ton dynamisme, ton optimisme sans faille même que je n'en avais plus, les nombreux croissants et tous tes petits cadeaux pour me remonter le moral. Merci d'avoir pris autant de temps pour me transmettre ton savoir, tes valeurs, ton optimisme, ta persévérance et tout ce qui, je l'espère, me permettra à mon tour de devenir un bon encadrant. Merci pour tout Verónica.

Merci à tous les membres actuels et passés de l'équipe 6 qui m'ont permis d'avancer dans de bonnes conditions, pour ces fous rires à table et le partage alimentaire, pour le « petit » coup de main lors de mes sorties terrain, pour nos péripéties travaux, déménagements, réparations, système D... Merci Laurence pour ton accueil à VetAgro, tes compétences et tes conseils. Delphine, nos longues discussions et ton côté très maternel ont toujours été très appréciables. Emilie, toi qui a réussi à me faire courir pendant 1 an, un exploit, mais qui fut bien arrosé à plus d'une reprise, ton départ de Lyon a laissé un vide. Jordan, en vrai, je ne sais pas si tu m'as aidé pour la science, mais ces moments passés avec toi au labo et en dehors étaient juste supers ! Annick, aussi discrète qu'efficace, tu as toujours su simplifier et résoudre tous les tracas administratifs. Avec toi, tout devient plus simple. Merci pour tous les services que tu m'as rendus au long de ces quatre années, et surtout ces derniers temps. Nylda, ma petite bourguignonne, merci pour ta bonne humeur, ta simplicité, nos discussions du terroir et surtout pour tous les services que tu m'as rendus. Et enfin, Manue ! Ah Manue ! Plus qu'une collègue, tu es la femme de l'ombre de toutes ces PCR, mon pense-bête, mon primeur, mon

charcutier, mon épaule et mon amie. Tu as vraiment contribué à rendre ces quatre années plus belles. Merci pour tout Manue !

Une pensée particulière aux stagiaires qui m'ont énormément aidé pour les expériences, mais qui m'ont également permis de progresser. Merci à Kévin, Anaïs, Camille, Raphaël et Hélène pour votre implication dans cette aventure avec moi. Je vous souhaite plein de bonheur pour la suite, et force et courage à toi Raphaël qui a décidé de te lancer à ton tour dans une thèse. Une petite pensée également pour toi Eva. Même si nous n'avons pas directement travaillé ensemble, les travaux préliminaires de ton master 2 m'ont été d'une grande aide.

Elo, dans quelle catégorie te placer ? Tu fais une parfaite transition entre l'équipe 6 et les étudiants. Même si tu n'as pas réussi à me remettre au sport, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, notamment la dernière année. Merci pour tous tes conseils, ta franchise, ta bonne humeur et surtout, surtout d'avoir supporté mes blagues vaseuses pendant 6 longues années. Chapeau bas !

J'en viens donc à tous les étudiants du labo qui de près ou de loin, bon ok surtout de loin, campus différent oblige, m'ont permis de me changer les idées quand le besoin s'en faisait ressentir. Merci Solène et Jordan pour ces soirées cocktails, jeux et aspirateurs. Marine, même si je n'ai toujours pas compris le principe du krachtbal, sache que je t'apprécie quand même. Béa, ma symbiose alimentaire, tant que tu me feras des twix, je m'engage à te faire de la tapenade. Laura, ne change rien, on t'aime comme tu es. Merci également à Delviana, Elodie P et Andréa qui ont apporté un peu de bonne humeur à Rockefeller.

Camille, de petit stagiaire perdu, tu m'as vu grandir petit à petit, et même me décomposer sur la fin, mais tu as toujours été là pour moi. Tes conseils, ta sagesse, ton amitié, la nourriture et tous ces bons moments passés ensemble ont vraiment été un régal pour moi au cours de ces années. Mais l'aventure ne fait que commencer, on a encore plein de bons moments à passer ensemble.

Elise, même si je n'ai jamais réellement eu besoin de tes services à la serre, c'est toujours avec grand plaisir que je passais te voir ou qu'on mangeait ensemble. Prends bien soin de Germaine et Hermione, tu as encore plein de choses à me raconter sur elles.

Sabine, merci de m'avoir fait une place dans ton bureau au Mendel, jusqu'à ce que le feu ne l'emporte. Dame Armelle, Maelenn et Elo, c'était un vrai plaisir de prendre le thé avec vous à 16h, même si je ne me sentais pas toujours à ma place.

Agnès, merci de m'avoir offert l'opportunité de faire ce premier stage au labo avec Marie, si dynamique, pétillante, enthousiasmante et enthousiasmée. En plus d'avoir énormément appris, j'y ai découvert un fabuleux métier et une discipline dans laquelle je me suis pleinement épanoui. C'est grâce à vous deux que j'ai par la suite pu apprendre avec Aude,

Guillaulne, Guillaume, Julien, Maria et Zahar au cours des deux stages qui ont suivi. Merci à vous tous pour tout ce que vous m'avez appris. Guillaulne, bien plus qu'un encadrant, tu m'as amené dans tes aventures jusqu'en Islande, des souvenirs impérissables. Mais au final, tout cela n'aurait pas été possible sans toi Sonia. Déjà 8 longues années qu'on se connaît. Toi qui m'as suivi pendant quasiment toute ma scolarité à la fac, merci pour tes conseils et ta bonne humeur.

Jonathan et Amélie, le duo AME qui m'a tellement aidé aussi bien pour la réalisation d'expérience de routine que pour la mise au point de nouvelle. La porte de votre plateforme a toujours été grande ouverte pour moi, et j'ai vraiment pris du plaisir à partager ces projets avec vous. Merci pour tout !

Audrey et Danis, merci pour votre patience et votre investissement qui m'ont permis d'y voir plus clair dans les nombreuses possibilités que m'offrait la bioinformatique. Toujours disponibles et réactifs, vous m'avez été d'une grande aide. Merci beaucoup.

Christian Paquet, merci de m'avoir initié à l'art de l'expérimentation animale, j'ai appris tant de choses à tes côtés ! Ta bonne humeur et ta motivation sont un vrai plaisir. Vanessa Louzier, merci pour toute ton aide, tu as toujours pris le temps nécessaire pour que l'on regarde ensemble les résultats afin de les valoriser au mieux. Ce fut toujours un plaisir de venir vous voir à l'école vétérinaire pour travailler avec vous.

Merci à tous les collègues du LEHNA pour leur aide durant cette thèse. Je pense notamment à Brice, Laurent et Myriam pour ces expériences que j'ai pu réaliser à l'ENTPE, mais également Laurent Simon à la Doua. Mais au final, c'est surtout à travers mon activité d'enseignement en biologie animale à vos côtés que j'ai appris à connaître les collègues d'E3S essentiellement et à m'intégrer parmi les étudiants du LEHNA. Merci surtout à toi Mathilde, binôme d'enseignements, de formation bio expérimentation, de congrès et surtout de traquenards. Duo gagnant avec Jérémy pour de bons moments assurés.

Même si ce fut plus court, merci à tous les collègues de la fac de pharma pour ces bons moments passés à enseigner avec vous, surtout les supers collègues de botanique Isa et Marie Geneviève ainsi que ceux de pharmacognosie Anne-Emmanuelle et Serge, qui m'ont permis de revenir aux sources de mon master. J'ai vraiment passé une très belle année à vos côtés.

Thibaut, merci pour cette super collaboration entre nos deux thèses. Ta simplicité, ta discrétion, ta rigueur et ton manuscrit ont été une grande source d'inspiration pour moi. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec toi.

Une pensée aussi aux collègues de l'hôpital de la Croix-Rousse de nous avoir ouvert les portes de leurs laboratoires. Merci à Frédéric Laurent et Olivier Dauwalder pour leurs connaissances

sur le MALDI-ToF et leur disponibilités. Merci également à Hélène Salord et Béatrice Charton pour leur aide technique et matérielle dans la réalisation des qPCR.

Enfin, un grand merci à ma famille pour leur soutien sans faille au cours de ces longues années d'études. Papa, Maman, même si vous n'avez pas toujours su expliquer facilement sur quoi je travaille, votre aide aussi bien morale que matérielle pendant toutes ces années à la fac m'ont permis de trouver ma voie et de m'épanouir pleinement dans mon travail. L'amour et la fierté que je peux voir dans vos yeux est le meilleur des encouragements pour avancer et ne pas laisser tomber, même dans les moments les plus difficiles.

## RÉSUMÉ

En ville, les eaux pluviales peuvent être collectées et dirigées vers des bassins d'infiltration. Elles se chargent, lors du ruissellement et du lessivage des sols et des toitures, en polluants divers : hydrocarbures, métaux lourds, polluants organiques persistants, médicaments, pesticides. Ces contaminants sont transportés essentiellement sous formes particulaires. Celles-ci s'accumulent à la surface des bassins d'infiltration et forment une couche de sédiments urbains riches en polluants qui représentent une nouvelle niche écologique pour des bactéries pathogènes opportunistes. On retrouve des Actinobactéries pathogènes dont *Nocardia cyriacigeorgica*. Pour l'heure, les études réalisées sur cette espèce en terme de physiopathologie l'ont été uniquement sur des souches cliniques et ne prennent pas compte les isolats environnementaux. Les principaux objectifs de ces travaux de thèse étaient d'évaluer la biodiversité spatio-temporelle des Actinobactéries présentes dans les sédiments d'un bassin d'infiltration avec un focus sur les espèces pathogènes du genre *Nocardia*, mais également d'établir des liens phylogénétiques entre des souches isolées d'un environnement urbain et des souches provenant de patients français atteints de nocardiose, et ainsi déterminer la dangerosité de ces clones environnementaux. Trois campagnes d'échantillonnage ont été réalisées dans un bassin d'infiltration de l'Est lyonnais (Django-Reinhardt) au printemps, en été et en automne. La biodiversité des communautés d'Actinobactéries a été décrite pour la première fois par méthode de séquençage nouvelle génération à l'aide du marqueur *hsp65*. La diversité infraspécifique des isolats environnementaux de *N. cyriacigeorgica* provenant du bassin d'infiltration et de souches cliniques fournies par l'Observatoire Français des Nocardioses a été quantifiée par une analyse multiloci (*rrs-hsp65-sodA-secA1*). La virulence des deux souches modèles urbaine EML446 et clinique GUH-2 de *N. cyriacigeorgica* a été évaluée par génomique comparative en étudiant le contenu en gènes de virulence des deux génomes, puis par expérimentation animale sur modèle murin d'immunoparalysie transitoire CLP 30 %. Les résultats de ce travail mettent en évidence la variabilité de la diversité spatio-temporelle des espèces pathogènes et indigènes d'Actinobactéries dominées par environ 80 % de bactéries du genre *Mycobacterium* mais également de *Nocardia* dans les sédiments du bassin d'infiltration Django-Reinhardt. Le mercure, le cuivre et une forte humidité semblent favoriser le développement des espèces pathogènes. La souche urbaine EML446, n'appartenant pas au phylogroupe contenant la souche hautement pathogène GUH-2, présente tout de même un fort pouvoir pathogène sur modèle murin d'immunoparalysie transitoire à une dose de  $1,0 \times 10^6$  UFC/souris ainsi que des contenus en gènes de virulence semblables. En conclusion, cette thèse a mis en évidence un risque microbiologique lié à la présence de l'espèce pathogène *N. cyriacigeorgica* dans un environnement urbain pollué en lien avec la gestion des eaux pluviales. Elle ouvre ainsi des perspectives sur la réorganisation taxonomique de *N. cyriacigeorgica* et une potentielle scission en trois espèces distinctes, pouvant avoir un impact en terme de virulence ou d'antibiorésistance, mais également sur l'utilisation de nouveaux outils permettant l'identification fine aussi bien clinique que dans l'environnement d'isolats ou de communautés bactériennes de *Nocardia* par métabarcoding à l'aide du marqueur *hsp65* et par MALDI-ToF MS.

**Mots clés :** Bactéries pathogènes opportunistes ; Bassin d'infiltration ; Biodiversité ; Diversité infraspécifique ; Ecologie microbienne ; Hydrologie urbaine ; Métabarcoding *hsp65* ; Modèle murin d'immunoparalysie ; *Nocardia cyriacigeorgica* ; Pollution urbaine ; Virulence.

## ABSTRACT

In cities, runoff waters are collected and directed toward infiltration basins. They collect during flooding and soils or roofs leaching diverse pollutants: hydrocarbons, organic matter, heavy metals. These accumulated particles on the infiltration basins surface constitute a layer of urban sediments rich in pollutants that constitute a new ecological niche for opportunistic pathogens. Pathogenic Actinobacteria whose *Nocardia cyriacigeorgica* are found here. For the moment, physiopathological studies performed on this species were done only on clinical strains and don't take into consideration environmental isolates. Main objectives of this thesis were to assess the spatial-temporal biodiversity of Actinobacteria present in the sediments of the infiltration basin with a more specific focus on *Nocardia* pathogenic species, and to establish phylogenetic links between strains from an urban environment and the ones arising from French patients affected by nocardiosis and so determine the hazardousness of these environmental clones. Three sampling campaigns were performed in the infiltration basin of the Lyon east area (Django-Reinhardt) during spring, summer and autumn. The actinobacterial biodiversity was described for the first time by next generation sequencing (NGS) tools with the *hsp65* marker. The infraspecific diversity of the environmental isolates of *N. cyriacigeorgica* arising from the infiltration basin et clinical strains provided by the French Observatory of Nocardiosis was quantified by a multilocus analysis (*rrs-hsp65-sodA-secA1*). The virulence of the two model strains urban EML446 and clinical GUH-2 of *N. cyriacigeorgica* was assessed by comparative genomics on the virulence genes of the two genomes, then by animal testing on a murine model of transient immunoparalysis CLP 30 %. Results highlight the variability of the spatial-temporal diversity of the pathogenic and indigenous Actinobacteria species dominated by around 80 % of the genus *Mycobacterium* and *Nocardia* present too in the sediments of the Django-Reinhardt infiltration basin. Mercury, copper and humidity seem to favor the development of pathogenic species. The urban strain EML446, that doesn't be part of the highly pathogenic GUH-2 phylogroup, harbors an important pathogenicity on the murine model of transient immunoparalysis at a dose of  $1,0 \times 10^6$  CFU/mice, as well as a similar virulence genes content. To conclude, this thesis highlights the microbial risk due to the presence of the *N. cyriacigeorgica* pathogenic species in a polluted urban environment linked to the runoff water management. It also opens new perspectives on the *N. cyriacigeorgica* taxonomic reorganization and a potential split in three distinct species that could impact the virulence and antibiotic resistance, as well as the use of new tools for the fine identification of clinic or environmental isolates of *Nocardia* bacterial communities by *hsp65* metabarcoding or by MALDI-ToF MS.

**Key words:** Opportunistic pathogen; Infiltration basin; Biodiversity; Infraspecific diversity; Microbial ecology; Urban hydrology; *hsp65* metabarcoding; murine model of transient immunoparalysis; *Nocardia cyriacigeorgica*; Urban pollution; Virulence

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	5
RÉSUMÉ .....	9
ABSTRACT .....	10
LISTE DES FIGURES .....	13
LISTE DES TABLEAUX .....	14
ABRÉVIATIONS.....	15
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	19
ORGANISATION DU DOCUMENT .....	23
PROGRAMMES DE RECHERCHE ET PLATEFORMES SOUTENANT CE TRAVAIL .....	24
CHAPITRE 1 .....	25
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....	25
1. Introduction sur les Actinobactéries.....	27
1.1. Histoire et origine .....	27
1.2. Taxonomie et techniques de classification .....	27
1.2.1. Classification morphologique et chimiotaxonomique .....	27
1.2.2. Classification génétique .....	31
1.3. La bio-informatique au service de la taxonomie .....	35
1.3.1. La MLSA, un nouvel outil de classification des <i>Nocardia</i> .....	35
1.3.2. La dDDH, la nouvelle référence en taxonomie bactérienne ? .....	36
1.3.3. L'ANI (Average Nucleotide Identity) .....	37
1.3.4. Etude des communautés bactériennes par métabarcoding.....	38
2. Ecologie des Actinobactéries .....	38
2.1. Les Actinobactéries dans l'environnement naturel .....	38
2.2. Les Actinobactéries et les environnements urbains .....	39
2.3. Pollution de l'eau liée à l'activité humaine .....	39
2.4. Le cas particulier de la gestion des eaux pluviales en environnement urbain.....	40
2.4.1. Les techniques alternatives de gestion des eaux pluviales.....	42
2.4.2. Les bassins d'infiltration .....	45
2.4.3. Spécificité de l'agglomération lyonnaise .....	47
2.4.4. Le bassin d'infiltration Django-Reinhardt .....	47
3. Une Actinobactérie pathogène opportuniste d'origine environnementale : <i>Nocardia</i> .....	51
3.1. Généralités sur le genre <i>Nocardia</i> .....	51
3.2. Taxonomie et génétique du genre <i>Nocardia</i> .....	56
3.3. Ecologie de <i>Nocardia</i> .....	60
3.3.1. Respiration anaérobie facultative de <i>Nocardia</i> ? .....	60
3.3.2. <i>Nocardia</i> et son métabolisme dans les environnements pollués .....	61
3.3.2.1. Les hydrocarbures comme source de carbone .....	62
3.3.2.2. Les pesticides comme potentielle source d'azote .....	64
4. Un environnement particulier : l'Homme et la nocardiose .....	64
4.1. Généralités .....	64
4.2. Épidémiologie .....	65
4.3. Formes cliniques .....	69



4.4.	Diagnostic clinique.....	72
4.5.	Traitement .....	78
5.	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> , une espèce pathogène modèle pour l'homme .....	79
5.1.	Généralités .....	79
5.2.	Diversité infra-spécifique de <i>N. cyriacigeorgica</i> .....	80
5.3.	Physiopathologie de <i>N. cyriacigeorgica</i> GUH-2 .....	83
6.	Conclusion .....	86
CHAPITRE II .....		87
PHYLOGENIE PHYSIOPATHOLOGIE DE SOUCHES URBAINES DE <i>NOCARDIA</i>		
<i>CYRIACIGEORGICA</i> .....		87
	<i>Préambule</i> .....	89
	<i>Conclusions du chapitre 2</i> .....	165
CHAPITRE III .....		169
IDENTIFICATION DE <i>NOCARDIA</i> PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI ToF .....		169
	<i>Préambule</i> .....	171
	<i>Conclusions du chapitre 3</i> .....	187
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....		189
	<i>Discussion générale</i> .....	191
	<i>Conclusions de ces travaux de thèse</i> .....	196
	<i>Perspectives de recherche à mener à la suite de ces travaux de thèse</i> .....	201
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES .....		205
	Littérature :.....	207
	Présentations orales :.....	209
	Présentations posters :.....	210

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1.1.** Observations microscopiques de *Gordonia* spp., *Nocardia cyriacigeorgica* et *Streptomyces griseus* après une coloration de Gram et *Mycobacterium avium* après une coloration de Ziehl-Neelsen

**Figure 1.2.** Observations macroscopiques de *Gordonia polyisoprenivorans*, *Nocardia cyriacigeorgica*, *Streptomyces griseus* et *Mycobacterium tuberculosis*

**Figure 1.3.** Schéma de la structure de la paroi des Actinobactéries

**Figure 1.2.** Phylogénie des Actinobactéries élaborée à partir de l'outil « Taxonomy » de NCBI

**Figure 2.1.** Relations entre l'imperméabilisation des sols et les différents modes d'évacuation des eaux pluviales.

**Figure 2.2.** Aménagements urbains permettant l'infiltration des eaux pluviales

**Figure 2.3.** Gestion des eaux pluviales à Lyon

**Figure 2.4.** Topographie et hydrologie de la région lyonnaise

**Figure 2.5.** Bassin versant recueillant les eaux pluviales collectées par le bassin de rétention/infiltration Django-Reinhardt et topographie du bassin d'infiltration

**Figure 3.1.** Aspects macroscopiques de cultures de *Nocardia cyriacigeorgica*

**Figure 3.2.** Aspects microscopiques de *Nocardia cyriacigeorgica*

**Figure 3.3.** Voie métabolique de dégradation du *sec*-octylbenzène par *N. cyriacigeorgica*

**Figure 4.1.** Les différentes formes de la nocardiose

**Figure 4.2.** Démarche de diagnostic microbiologique d'une nocardiose

**Figure 4.3.** Principe de fonctionnement du MALDI-ToF MS

**Figure 4.4.** Spectres de masse de différentes espèces de *Nocardia* réalisés à l'aide du MALDI-ToF MS Bruker BioTyper

**Figure 5.1.** Phylogénie de *Nocardia cyriacigeorgica* montrant la diversité infra-spécifique

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.1.** Caractéristiques morphologiques et physiologiques des principaux genres d'Actinobactéries ([Hidri & Rodriguez-Nava, 2018](#))

**Tableau 1.2.** Caractéristiques chimiotaxonomiques des principaux genres d'actinobactéries

**Tableau 3.1 :** Ensemble des espèces de *Nocardia* décrites et officiellement reconnues. *Les espèces surlignées en bleu ont été décrites dans des cas de nocardiose humaine.*

**Tableau 4.1.** Données épidémiologiques mondiales de la nocardiose

## ABRÉVIATIONS

ADNr/DNA	Acide Désoxyribonucléique (ribosomique)
Al	aluminium
ANI	Average Nucleotide Identity
ARN	Acide Ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Triphosphate
BCP	Bromocrésol Pourpre
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BHI	Brain Heart Infusion
BIBI	BioInformatic Bacterial Identification
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BRGM	Bureau de Recherche Géologique et Minière
Ca	calcium
Cd	cadmium
CDS	Coding DNA Sequence
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNR	Centre National de Référence
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COS	Gélose Columbia + 5 % de sang de mouton
COURLY	Communauté Urbaine de Lyon
Cu	cuivre
DI	Dose Infectante
DL	Dose Létale
DOI	Digital Object Identifier
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
(d)DDH	(digital) DNA-DNA Hybridization
E <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation
ECCMID	European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i> , par exemple
EML	Ecologie Microbienne Lyon
ENTPE	Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat
<i>etc</i>	<i>et cetera</i> , et ainsi de suite
ETM	Elément Trace Métallique
Fe	fer
FROGS	Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution
FST	Faculté des Sciences et Technologies
GC %	taux de Guanine + Cytosine
GGDS	Genome-to-Genome Distance Calculator
GPS	Global Positioning System
GRAIE	Groupe de Recherche Rhône Alpes sur les Infrastructures et l'Eau
GUH	Georgetown University Hospital
<i>gyrB</i>	DNA gyrase, subunit B

HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HeLa	Lignée cellulaire Henrietta Lacks
Hg	mercure
<i>hsp65</i>	heat shock protein 65 kDa
IAI	Institut des Agents Infectieux
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> , c'est-à-dire
IFM	Medical Microbiology Research Center
IMU	Intelligence des Mondes Urbains
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
INSA	Institut National des Sciences Appliquées
<i>Irp</i>	iron-responsive element binding protein
ITS	Internal Transcribed Spacer
IV	intraveineuse
K	potassium
kDa	kilo Dalton
K2P	Kimaru-2-paramètres
LabEx	Laboratoire d'Excellence
LDH	Lactate Déshydrogénase
MALDI-ToF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
<i>mat</i>	méthionine sulfone N-acétyltransférase
<i>mce</i>	mammalian cell entry
MDR	Multi-Drug Resistance
Mg	magnésium
MLSA	Multilocus Sequence Analysis
Mn	manganèse
<i>mbtC</i>	dimethylamine corrinoid protein
m/z	ratio masse / charge ionique
<i>nar</i>	nitrate reductase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nf	PCR spécifique <i>Nocardia farcinica</i>
NG	PCR spécifique <i>Nocardia</i> genre
NGS	Next Generation Sequencing
<i>nir</i>	nitrite reductase
NRPS	Nonribosomal Peptide Synthase
nt	nucléotides
OFN	Observatoire Français des Nocardioses
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTHU	Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine
PI/PII/PIII	Phylogroupe I/II/III
pb	paires de bases
Pb	plomb
PCB	Polychlorobiphényles
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction – Random Fragment Length
	Polymorphism
PE_PGRS	Polymorphic GC-rich Repetitive Sequence

pH	potentiel Hydrogène
PKS	Polyketide Synthase
POP	Polluant Organique Persistant
(Δ)T <sub>m</sub>	(difference de) melting Temperature
<i>rpoB</i>	RNA polymerase β subunit
<i>rrs</i>	16S rRNA
SAGE	Schéma d'Aménagement et de Gestion des Eaux
<i>secA1</i>	protein translocase subunit A1
SMT-TMP	Sulfaméthoxazole-Triméthoprim
<i>sodA</i>	superoxide dismutase A
<i>soxR</i>	redox-sensitive transcriptional activator SoxR
STEP	Station d'Épuration
UFC	Unité Formant une Colonie
UV	Ultra-Violet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
ZABR	Zone Atelier sur le Bassin du Rhône
Zn	zinc



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les maladies infectieuses sont causées par des microorganismes pathogènes tels que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons (OMS, 2019). Ces maladies se développent chez tous les organismes vivants (animaux, végétaux, plantes) et forment des interactions durables dans la nature, régissant la stabilité des écosystèmes (régulation des populations de prédateur ou de parasites...). La plupart des pathogènes co-évoluent avec leur hôte depuis très longtemps. Ces maladies infectieuses peuvent être plus ou moins contagieuses et leur mode de transmission variable. Chez l'homme, elles sont responsables d'un tiers de la mortalité mondiale avec 178 millions de décès chaque année. Malgré les nombreux efforts en terme d'hygiène, de vaccination et de traitement antibiotique, les maladies infectieuses demeurent la troisième cause de mortalité dans les pays développés (Institut Pasteur, 2019).

Parmi les maladies infectieuses d'origine bactérienne, on retrouve les infections dues aux pathogènes stricts, *i.e.* qui affectent des sujets sains (tuberculose, lèpre, choléra...), ainsi que celles dues aux pathogènes opportunistes. Ces derniers sont généralement soit des commensaux de l'homme, soit saprophytes dans l'environnement. L'infection se produit lorsque les conditions liées à l'hôte ou au microorganisme deviennent favorables. Le sujet peut présenter une fragilité due à une immunodépression (*e.g.* immunosuppresseurs, maladies auto-immunes), à une maladie chronique (*e.g.* bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), mucoviscidose), à son âge (enfants, personnes âgées) ou à un déséquilibre de son microbiote (antibiothérapie) qui pourrait favoriser le surdéveloppement de ces bactéries. Plusieurs facteurs peuvent être liés à leur développement lors du déclenchement d'une infection, par exemple la virulence qui favorise la colonisation de l'hôte (adhésines, toxines, etc.), la dose bactérienne (qui pourrait, même faible, être infectante en fonction des conditions de l'hôte) ou encore le temps d'exposition. En terme de santé publique, certaines bactéries pathogènes opportunistes sont majoritairement isolées en milieu hospitalier que ce soit dans des cas d'infections nosocomiales ou communautaires (Bryant *et al.*, 2016). On retrouve notamment les bacilles à coloration de Gram négative non-fermentaires telles que *Pseudomonas aeruginosa*, le troisième agent étiologique retrouvé en clinique (Berthelot *et al.*, 2005), mais également d'autres bactéries pathogènes opportunistes d'intérêt médical comme *Burkholderia cepacia* ou *Stenotrophomonas maltophilia* ainsi que des Actinobactéries dont les Mycobactéries atypiques ou les *Nocardia*.

Parmi les Actinobactéries pathogènes opportunistes, les Mycobactéries atypiques (du genre *Mycobacterium*) sont essentiellement responsables d'affections pulmonaires, mais peuvent également causer des atteintes ganglionnaires, ostéoarticulaires et cutanées (Chuard & Erard, 2011). Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans l'eau et le sol et ont déjà été isolées dans des environnements pollués comme des rivières en Algérie (Djouadi *et al.*, 2017) ou des lacs à proximité de zones industrielles en Chine (Cui *et al.*, 2016). Quant aux *Nocardia*,



elles sont responsables de formes cliniques multiples allant d'une atteinte cutanée isolée à des formes pulmonaires aiguës, à évolution rapide ou chroniques suivies d'un fort risque de dissémination par voie sanguine, notamment vers le cerveau chez les patients fortement immunodéprimés (Rodriguez-Nava *et al.*, 2019). La nocardiose invasive est une infection opportuniste rare mais grave associée à une mortalité d'environ 30% pouvant atteindre 50% en cas d'atteinte cérébrale. Elle demeure largement sous-diagnostiquée à cause de ses symptômes aspécifiques, mais Pujic *et al.*, (2015) estiment son incidence mondiale à plus d'un million de cas par an. L'espèce hautement pathogène *N. cyriacigeorgica* est l'une des plus impliquées dans la nocardiose humaine à l'échelle mondiale (Lebeaux *et al.*, 2018 ; Paige & Spelman, 2019 ; Valdezate *et al.*, 2016). La contamination des patients se fait généralement par transmission des germes *via* l'intermédiaire d'aérosols contaminés provenant de l'environnement. Les propriétés hydrophobes de la bactérie expliquent sa présence dans des environnements pollués aux hydrocarbures tels que des sables bitumineux (Khan *et al.*, 1997 ; Quatrini *et al.*, 2010) ou des sédiments urbains d'un bassin de rétention (Sébastien *et al.*, 2014 ; Bernardin-Souibgui *et al.*, 2017).

Aujourd'hui, le développement des villes induit l'apparition de plus en plus d'environnements contaminés. Parmi eux se trouvent les bassins d'infiltration qui font partie des systèmes de gestion des eaux de ruissellement des villes ou des zones industrielles. En effet, l'urbanisation croissante entraîne une forte imperméabilisation des surfaces, réduisant les phénomènes naturels d'infiltration des eaux pluviales dans l'aquifère. L'objectif de ces bassins d'infiltration est de collecter ces eaux de ruissellement afin de réapprovisionner la nappe phréatique et ainsi limiter les inondations en ville. Cependant, les polluants issus de l'activité humaine tels que les HAP, les PCB, les pesticides, les POP et les métaux lourds s'accumulent à la surface de ces infrastructures (Chocat, 1997) générant ce que l'on appelle des anthroposols ou sédiments urbains (Bedell *et al.*, 2013), constituant un environnement favorable au développement de *N. cyriacigeorgica* ou d'autres pathogènes opportunistes.

La présence de clones environnementaux de l'espèce hautement pathogène *N. cyriacigeorgica* pose des questions quant au risque microbiologique lié à la nouvelle niche écologique que représentent ces environnements pollués. Les risques de dispersion de la bactérie par infiltration jusque dans l'aquifère, ou par aérosolisation dans l'atmosphère, ne sont pas connus. De même, les paramètres physico-chimiques environnementaux expliquant la répartition spatio-temporelle de cette bactérie restent largement méconnus.

S'inscrivant dans une thématique d'écologie microbienne en milieu urbain, cette thèse a pour but (i) de proposer des méthodes simples et rapides de détection et d'identification des Actinobactéries pathogènes opportunistes afin d'évaluer leur diversité spatio-temporelle en fonction des paramètres physico-chimiques des sédiments urbains, (ii) de déterminer la dangerosité et la dose infectante d'une souche environnementale de *N. cyriacigeorgica* vis-à-vis d'une souche clinique modèle par génomique comparative et physiopathologie à l'aide d'un modèle murin d'immunoparalysie transitoire, et (iii) d'évaluer la variabilité

infraspécifique de l'espèce pathogène *N. cyriacigeorgica* à partir de souches urbaines par rapport à celles identifiées par l'Observatoire Français des Nocardioses.



## ORGANISATION DU DOCUMENT

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres dont deux sous formes d'articles scientifiques qui répondent aux objectifs de la thèse. Le **premier chapitre** est une synthèse bibliographique qui fait état des connaissances actuelles qui ont mené à l'élaboration de ce projet de recherche. Dans un premier temps, un bref portrait des Actinobactéries sera dépeint afin de mieux comprendre l'influence de la pollution sur ces bactéries. Les outils actuels permettant la classification bactérienne et l'étude de leur diversité par des outils de biologie moléculaire seront présentés. Ces données seront remises dans un contexte d'hydrologie urbaine qui, par l'imperméabilisation des sols, perturbe le cycle de l'eau. Une attention plus particulière sera portée à notre modèle d'étude, le bassin d'infiltration Django-Reinhardt. Enfin, *Nocardia*, notre modèle d'étude biologique, sera présentée. Après avoir décrit son écologie, notamment dans les milieux pollués, son implication en pathologie humaine sera détaillée et plus particulièrement l'espèce *N. cyriacigeorgica*, qui retient toute l'attention de cette thèse.

Le **deuxième chapitre** présente deux articles et s'intéresse à l'influence de l'origine clinique ou environnementale de deux souches de *N. cyriacigeorgica* sur leur virulence à travers le contenu en gènes de virulence et par physiopathologie sur un modèle murin d'immunoparalysie transitoire. Il est également question d'évaluer la diversité infraspécifique de cette espèce par une approche multiloci, en essayant de rapprocher cette diversité aux différentes origines des souches de *N. cyriacigeorgica*.

Le **troisième chapitre** propose un développement méthodologique autour du MALDI-ToF MS afin de permettre une identification plus rapide et plus fiable de *Nocardia*. Il est question ici d'évaluer les performances de la nouvelle base de données Vitek® MS IVD V3.0 sur les souches de *Nocardia* isolées par l'Observatoire Français des Nocardioses lors de l'année 2014 ainsi que sur des souches pathogènes environnementales. L'efficacité d'une étape préliminaire d'extraction des protéines ribosomales est évaluée ainsi que l'influence d'un milieu de culture pauvre vis-à-vis d'un riche.

Le **quatrième chapitre** est la conclusion générale qui reprend les grandes questions traitées dans le cadre de cette thèse sur l'impact de l'anthropisation sur les communautés de *Nocardia* dans un bassin d'infiltration. L'autre point fort de ces travaux est l'étude de la diversité phylogénétique au sein de l'espèce pathogène *N. cyriacigeorgica* et l'impact que cela peut avoir en termes cliniques. Ce manuscrit se termine sur des perspectives qui permettraient d'approfondir ces travaux de recherche commencés au cours de cette thèse.

## PROGRAMMES DE RECHERCHE ET PLATEFORMES

### SOUTENANT CE TRAVAIL

Ces travaux de thèse ont été soutenus par une allocation doctorale de recherche de la région Auvergne-Rhône-Alpes, du dispositif ARC environnement (axe Ecotechnologie). Les expérimentations ont été soutenues par l'Observatoire Français des Nocardioses (OFN, Institut des Agents Infectieux, Hôpital de la Croix Rousse), bioMérieux ainsi que le LabEx IMU (Intelligence des Mondes Urbains). Un support technique a été apporté par l'Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine (OTHU) pour l'accès aux bassins d'infiltration ainsi que des données récoltées (<http://www.graie.org/othu/>) sur la ZABR (Zone Atelier Bassin du Rhône), tous deux soutenus par le Grand Lyon ainsi que l'Agence Nationale de la Recherche ANR-17-CE04-0010 (Infiltron)

Ces travaux ont également bénéficié du soutien technique et matériel des plateformes du Laboratoire d'Ecologie Microbienne (AME (Activités Microbiennes dans l'Environnement), CESN (Centre d'Etude des Ressources Naturelles), Ibio, PARMIC (Plateforme d'analyse des ressources Microbiologiques), PGE (Plateforme Génomique Environnementale)) et du Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (Chimie des Polluants et Ecologie Isotopique).

# **CHAPITRE 1**

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



## 1. Introduction sur les Actinobactéries

### 1.1. Histoire et origine

Les Actinobactéries étaient autrefois appelées Actinomycètes (Ludwig *et al.*, 2012), terme dérivé du grec (*Aktis*) « rayon » et (*mukes*) « champignon ». En effet, tout comme les champignons filamenteux, ces Actinomycètes ont longtemps été considérés comme des champignons car certains d'entre eux sont capables de produire des filaments rappelant le mycélium, voire même des formes de sporulation appelées sporanges, intervenant dans la reproduction et la dissémination de certains genres tels que *Streptomyces* et *Frankia* (Barka *et al.*, 2016). Leurs filaments sont néanmoins toujours très minces (1  $\mu\text{m}$ ) alors qu'ils atteignent 3  $\mu\text{m}$  voire plus chez les champignons. Cependant, c'est bien le terme « Actinobactérie » qu'il faut utiliser depuis 2012 (Ludwig *et al.*, 2012) car ces microorganismes sont des cellules procaryotes ne possédant pas de noyau, avec une paroi cellulaire composée de peptidoglycane (Barka *et al.*, 2016) et « avec une traduction co-transcriptionnelle de leurs chromosomes qui traduisent les ARN messagers naissants en protéines » (Martin & Koonin, 2006). Toutes ces propriétés au niveau de la paroi et des membranes rendent les Actinobactéries sensibles aux antibiotiques (*i.e.* des antibactériens) et non aux antifongiques car il s'agit de vrais procaryotes. Même si c'est une évidence aujourd'hui, cela ne l'était pas autrefois lorsqu'on les considérait comme des champignons peu évolués alors appelés Actinomycètes (Barka *et al.*, 2016).

### 1.2. Taxonomie et techniques de classification

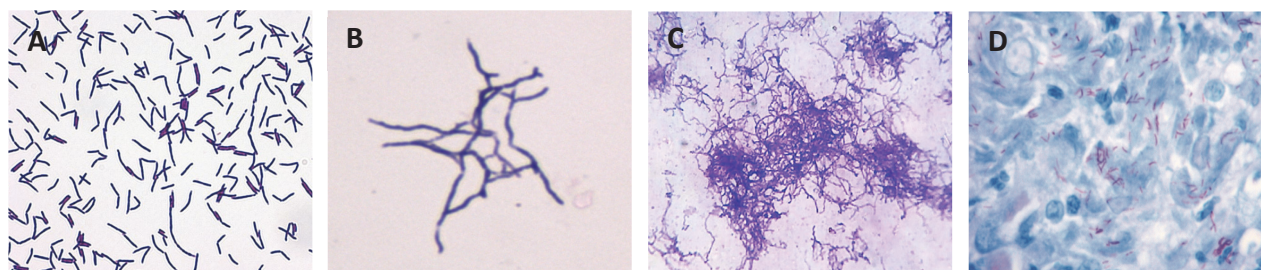
#### 1.2.1. Classification morphologique et chimiotaxonomique

La taxonomie est la science de la classification des organismes vivants (Brisse, 2018). Le mot est issu du grec (*taxis*) « classement » et (*nomos*) « règle ». L'identification des Actinobactéries a pendant longtemps été basée sur des critères morphologiques et physiologiques (Lechevalier & Lechevalier, 1965). Leurs aspects morphologiques, aussi bien macro- que microscopiques, peuvent être très variables du fait de leur grande diversité d'habitats (environnement, hôte, culture *in vitro*...) et de leur production de métabolites secondaires (pigmentation essentiellement, odeur...). Ceci est notamment très visible chez les genres *Gordonia* et *Streptomyces* qui arborent des couleurs aussi variées que les pigments produits (métabolites secondaires).

D'un point de vue microscopique, plusieurs formes sont retrouvées chez les Actinobactéries allant des coques (*Rhodococcus*) aux filaments (*Frankia*, *Nocardia*, *Streptomyces*) en passant par des bacilles (*Gordonia* et *Mycobacterium*) (Sykes & Skinner, 1971) (Figure 1.1). Ces caractères microscopiques sont mis en évidence grâce à la coloration de Gram rendant les Actinobactéries à Gram positif pour la plupart des genres (*Streptomyces*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Bifidobacterium*, ...) ou Gram variable comme c'est le cas du genre *Nocardia* qui présente un aspect tigré assez caractéristique. D'autres exceptions comme le genre *Mycobacterium* ne prennent pas la coloration de Gram mais d'autres colorations plus

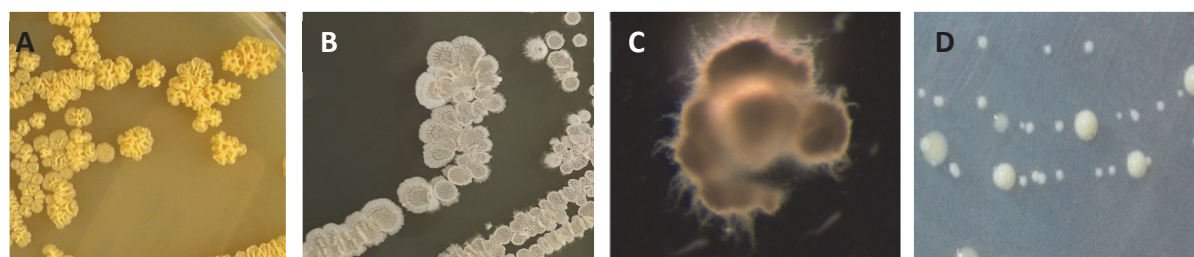


adaptées telles que celle de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun sont utilisées pour mettre en évidence ces microorganisme acido-alcoolorésistants.



**Figure 1.1.** Observations microscopiques de *Gordonia* spp. (A), *Nocardia cyriacigeorgica* (B) et *Streptomyces griseus* (C) après une coloration de Gram et *Mycobacterium avium* (D) après une coloration de Ziehl-Neelsen.

Au niveau de leur morphologie macroscopique, l'aspect superficiel peut être poudreux comme pour *Nocardia* (**Figure 1.2 B**), mais également plus luisant en fonction des genres notamment chez *Mycobacterium* (**Figure 1.2D**) (Sykes & Skinner, 1971). Les colonies peuvent également être incrustées dans la gélose, ce qui est typiquement retrouvé chez les *Nocardia* et les *Streptomyces* (Lechevalier & Lechevalier, 1965). Ces observations macroscopiques dépendent cependant grandement du milieu de culture utilisé.



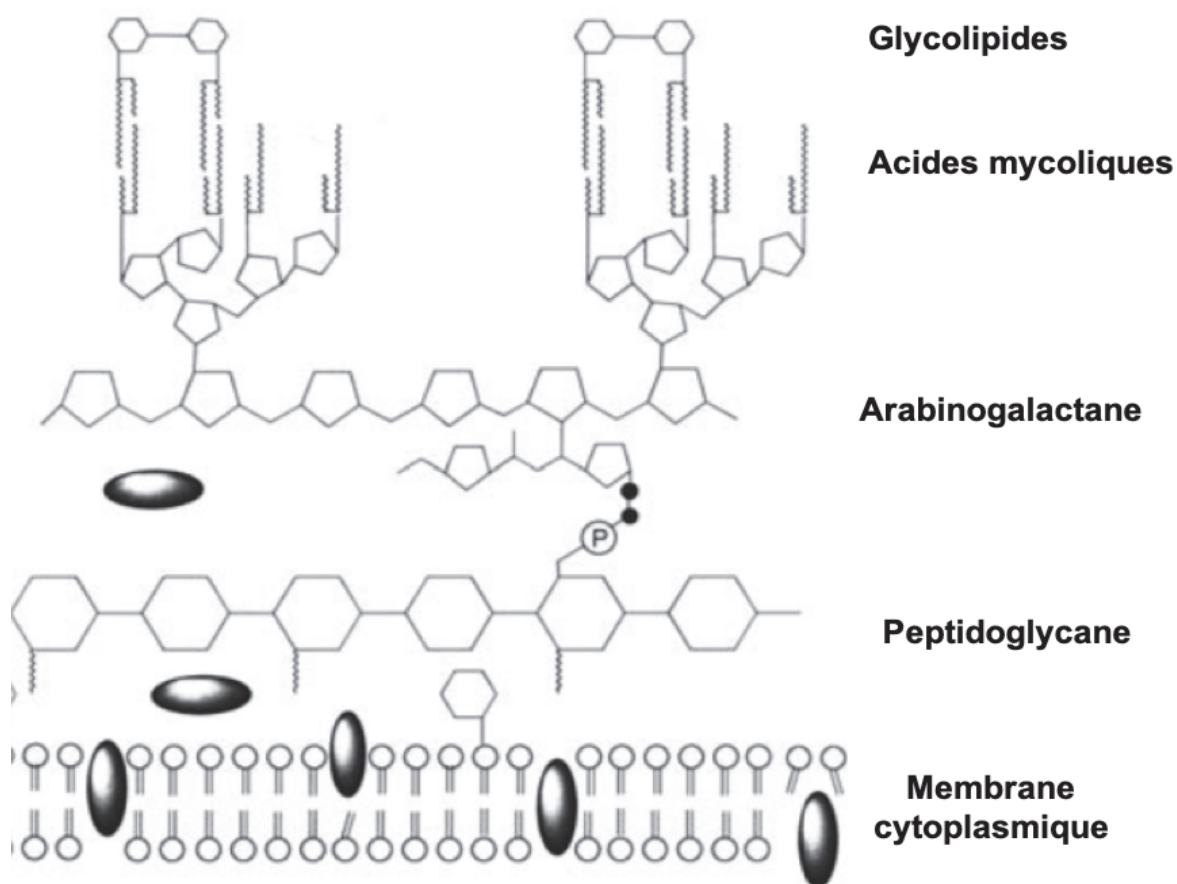
**Figure 1.2.** Observations macroscopiques de *Gordonia polyisoprenivorans* sur milieu BHI (A), *Nocardia cyriacigeorgica* sur milieu Bennett (B), *Streptomyces griseus* sur milieu NMMP modifié (C) et *Mycobacterium avium* sur milieu milieu Löwenstein-Jensen (D).

Globalement, les Actinobactéries sont pour la plupart aérobies strictes mais certaines sont capables de croître en microaérobie voire anaérobie, phénomène ainsi retrouvé chez le genre *Actinomyces* (Georg *et al.*, 1965).

Les caractéristiques générales citées précédemment ne sont malheureusement pas suffisamment discriminantes pour permettre l'identification de différentes espèces au sein d'un même genre. Néanmoins, il est toujours important dans la taxonomie bactérienne de bien prendre en compte les caractéristiques physiologiques des microorganismes afin d'avoir une caractérisation qui permettra de mieux les classer. Chez les Actinobactéries, certaines caractéristiques physiologiques peuvent même être utilisées pour différencier quelques genres. Par exemple, la résistance au lysozyme est un caractère pouvant être discriminant puisqu'il n'est retrouvé que chez *Nocardia* et partiellement chez *Rhodococcus*, deux genres phylogénétiquement proches. Dans ce cas particulier, l'absence de mycélium aérien chez

*Rhodococcus* peut également être pris en compte pour différencier ces deux genres (voir **Tableau 1.1**). Il est possible d'utiliser d'autres critères comme l'acido-alcool résistance pour certaines Actinobactéries servant à leur caractérisation et classification (**Tableau 1.1**).

Dans les années 1960-70, le développement des techniques de chimie analytique a permis l'utilisation des propriétés chimiques des bactéries (composition en sucres de la paroi, en ménaquinones ou en phospholipides) comme caractères chimiotaxonomiques discriminants (Lechevalier & Lechevalier, 1965). Ils ne sont cependant pas toujours suffisamment précis pour faire apparaître des différences entre deux genres, en particulier pour *Gordonia*, *Nocardia* et *Rhodococcus*. Si l'on prend en compte certaines caractéristiques, comme par exemple leurs GC % (taux de guanine + cytosine) qui sont proches (63 à 73 %) ou la paroi de type IV composée d'arabinose, de galactose et d'un acide méso-diaminopimélique (**Tableau 1.2**). La chaîne carbonée de l'acide mycolique comporte quant à elle une plus grande variabilité permettant une bonne différenciation entre certains genres (*Gordonia/Nocardia* : 44-48/60-66 carbones vs *Rhodococcus* 34-52 carbones). Quant au genre *Mycobacterium*, il possède une chaîne carbonée plus longue que les autres genres (60 à 90 carbones). On peut également citer le genre *Streptomyces* qui ne possède ni sucre, ni acide mycolique dans sa paroi (**Tableau 1.2**). La plupart de ces caractères chimiotaxonomiques sont en fait des composants de la membrane plasmique particulière des Actinobactéries (**Figure 1.3**).



**Figure 1.3.** Schéma de la structure de la paroi des Actinobactéries (d'après Schroeder *et al.*, 2002).

**Tableau 1.1.** Caractéristiques phénotypiques des principaux genres d'Actinobactéries (Hidri & Rodriguez-Nava, 2018)

Genre	Mycélium aérien	Résistance au lysozyme	Mobilité	Acido-alcool résistance
<i>Actinomadura</i>	V	-	-	-
<i>Dermatophilus</i>	-	-	+	-
<i>Gordonia</i>	-	-	-	Partielle
<i>Nocardia</i>	+	+	-	Partielle
<i>Nocardiosis</i>	+	-	-	-
<i>Oerskovia</i>	-	-	+	-
<i>Rhodococcus</i>	-	V	-	Partielle
<i>Streptomyces</i>	+	-	-	-
<i>Tsukamurella</i>	-	+	-	Partielle
+ : présence ; - : absence ; V : 11 à 89% des souches possèdent ce caractère				

**Tableau 1.2.** Caractéristiques chimiotaxonomiques des principaux genres d'Actinobactéries (Hidri & Rodriguez-Nava, 2018)

Genre	Type de paroi	DAP	Sucre caractéristique de la paroi	Acides mycoliques (nombre de C)	Ménaquinones prédominantes (MK)
<i>Actinomadura</i>	III B	meso	Madurose	NR	9
<i>Corynebacterium</i>	NR	meso	Arabinose/Galactose	22-38	8/9
<i>Dermatophilus</i>	III	meso	Madurose	Aucun	8
<i>Dietzia</i>	IV	meso	Arabinose/Galactose	34-38	8
<i>Gordonia</i>	IV	meso	Arabinose/Galactose	48-66	9
<i>Mycobacterium</i>	IV	meso	Arabinose/Galactose	60-90	9
<i>Nocardia</i>	IV	meso	Arabinose/Galactose	44-60	8/9
<i>Nocardiosis</i>	III C	meso	Aucun	Aucun	10
<i>Oerskovia</i>	VI	Aucun	Galactose	Aucun	9
<i>Rhodococcus</i>	IV	Meso	Arabinose/Galactose	34-52	8
<i>Skermania</i>	IV	Meso	Arabinose/Galactose	58-64	8
<i>Streptomyces</i>	I	L	Aucun	Aucun	9
<i>Tsukamurella</i>	IV	Meso	Arabinose/Galactose	64-78	9
DAP : acide x-diaminopimélique ; NR : non renseigné					

### 1.2.2. Classification génétique

Dans les années 1980, les techniques de biologie moléculaire basées sur l'étude de l'ADN deviennent de plus en plus abordables, résolutive et rapides, rendant les techniques de caractérisation chimiotaxonomique moins avantageuses. Ces avancées technologiques ont donc permis la création d'une nouvelle définition de l'espèce bactérienne et qui fait toujours foi actuellement pour la description : « une espèce bactérienne regroupe les souches ayant un taux de réassociation d'ADN de 70 % ou plus et un  $\Delta T_m$  de 5°C ou moins, les deux devant être considérés » (Wayne *et al.*, 1987). La DDH (DNA-DNA hybridization ou hybridation ADN-ADN) est utilisée par les taxonomistes depuis les années 1960 pour établir les relations entre deux souches en termes d'homologie et ainsi définir de nouvelles espèces. Comme son nom l'indique, elle repose sur l'hybridation entre deux brins d'ADN préalablement dénaturés pour être à l'état monobrin. Un taux de recombinaison supérieur à 70 % indique que nous sommes en présence de deux souches appartenant à la même espèce (Mccarthy & Bolton, 1963 ; Schildkraut *et al.*, 1961). Cette technique est de nos jours toujours la référence pour établir une nouvelle espèce (Goris *et al.*, 2007). Malheureusement, elle est très longue, chère et varie entre les réplicats et encore plus d'un laboratoire à un autre. En revanche, pour les autres niveaux taxonomiques, il n'existe pour l'heure aucun consensus scientifique bien définis et leur définition/délimitation est basée sur la cohérence biologique (Wayne *et al.*, 1987).

Depuis une vingtaine d'années, le séquençage s'est largement développé, bouleversant la classification des Actinobactéries, mais également celle des autres eubactéries. C'est le gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomique 16S qui a été choisi pour établir cette classification (Caumette *et al.*, 2016). En effet, le gène de l'ARNr 16S (également appelé *rrs*) est un gène de ménage, *i.e.* qu'il est exprimé dans tous les types de cellules et dont les produits assurent une fonction indispensable à leur survie. Ce gène, d'une longueur d'environ 1500 pb (paires de bases) code pour la petite sous-unité des ribosomes procaryotes. Il est très utilisé en phylogénie pour reconstruire l'histoire évolutive car sa vitesse d'évolution lente permet d'établir des divergences génétiques anciennes (Woese & Fox, 1977). Chez les Actinobactéries, ce sont les 500 premières paires de bases qui sont les plus informatives car elles contiennent des séquences très conservées de même que des séquences plus variables, permettant ainsi d'établir une phylogénie fiable (Clarridge *et al.*, 2004 ; Roth *et al.*, 1998). La phylogénie des Actinobactéries est donc basée sur ce marqueur moléculaire universel qui n'est malheureusement pas suffisamment résolutif pour ce phylum (Roth *et al.*, 1998). En effet, certaines espèces, voire certains genres, ne peuvent pas être délimitées de manière précise à l'aide de ce seul gène car le polymorphisme de ces séquences n'est pas suffisamment fort (Barka *et al.*, 2016). Roth *et al.*, (1997) avaient d'ailleurs proposé l'utilisation de l'ITS (internal transcribed spacer) pour pallier aux limites du gène *rrs* mais également du gène *hsp65* pour l'identification des mycobactéries.

Depuis quelques années, le gène *rrs* est également devenu un marqueur largement utilisé pour l'évaluation de la diversité des communautés bactériennes dans l'environnement

à l'aide du métabarcoding. En effet, le marqueur est maintenant utilisé en détection directe, *i.e.* par extraction d'ADN sur un échantillon complexe puis par séquençage massif (NGS). Nous reviendrons sur cette technique par la suite. D'ailleurs, plusieurs travaux ont vu le jour, grâce à l'utilisation du gène *rrs* par cette approche de métabarcoding, notamment dans des études pour déterminer la composition des communautés bactériennes du microbiote intestinal humain (Lu & Liu, 2016), dans des études pour évaluer les modifications des communautés bactériennes telluriques induites par une pollution aux métaux lourds (Babcsanyi *et al.*, 2017) ou encore dans le suivi de communautés bactériennes indigènes d'environnements souterrains tels que les grottes afin d'estimer l'impact de l'anthropisation sur ces milieux restreints (Alonso *et al.*, 2019). Dans une étude de la composition bactérienne d'un environnement pollué aux hydrocarbures, Marti *et al.*, (2017) avaient travaillé à l'aide de ce marqueur du gène *rrs*. Ayant constaté que les Actinobactéries font partie des groupes bactériens majoritaires dans ce genre d'environnement pollué, ils ont pointé la nécessité de développer en métabarcoding d'autres marqueurs moléculaires qui permettraient une meilleure identification des Actinobactéries. En effet, pour ce phyla, la résolution du gène *rrs* se limite bien souvent au genre avec ce type d'analyse et ne permet malheureusement pas de faire la distinction entre les espèces pathogènes ou non présentes à l'intérieur d'un même genre.

Les Actinobactéries constituent un des plus grands phyla en taxonomie bactérienne avec 6 classes, 29 ordres (dont 18 compris dans la seule classe des Actinobactéries), 64 familles (dont 47 dans la seule classe des Actinobactéries) et 371 genres (NCBI consulté le 04.09.2019). Ces chiffres varient extrêmement vite puisque Goodfellow *et al.*, (2012) n'avaient dénombré que 50 familles et 221 genres sept ans plus tôt (Figure 1.2).



Classe n = 6	Ordre n=29	Famille n = 64
Actinobacteria	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae Iamiaeae Ilumatobacteraceae Microthrixaceae
	Acidothermales	Acidothermaceae
	Actinomycetales	Actinomycetaceae
	Actinopolysporales	Actinopolysporaceae Mzabimycetaceae
	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae
	Catenulisporales	Actinospicaceae Catenulisporaceae
	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae Dietziaceae Gordoniaceae Mycobacteriaceae Nocardiaeae Segniliparaceae Tsukamurellaceae Williamsiaceae
	Frankiales	Cryptosporangiaceae Frankiaceae Motilbacteraceae Sporichthyaceae
	Geodermatophilales	Geodermatophilaceae
	Glycomycetales	Glycomycetaceae
	Jiangellales	Jiangellaceae
	Kineosporiales	Kineosporaceae
	Micrococcales	Beutenbergiaceae Bogoriellaceae Cellulomonadaceae Demequinaceae Dermabacteraceae Dermacoccaceae Dermatophilaceae Intrasporangiaceae Jonesiaceae Microbacteriaceae Micrococcaceae Promicromonosporaceae Rarobacteraceae Runiaceae Sanguibacteraceae
	Micromonosporales	Micromonosporaceae
	Nakamurellales	Nakamurellaceae
Coriobacteriia	Propionibacteriales	Norcardioidaceae Propionibacteriaceae
	Pseudonocardiales	Pseudonocardiaceae
	Streptomycetales	Streptomycetaceae
Niriliruptoria	Streptosporangiales	Nocardiopsaceae Streptosporangiaceae Thermomonosporaceae
	Coriobacteriales	Atopobiaceae Coriobacteriaceae
	Eggerthellales	Eggerthellaceae
Rubrobacteria	Egibacteriales	Egibacteraceae
	Egicoccales	Egicoccaceae
	Euzebyales	Euzebyaceae
Thermophilia	Nitriliruptorales	Nitriliruptoraceae
	Gaiellales	Gaiellaceae
	Rubrobacteriales	Rubrobacteraceae
Thermophilales	Solirubrobacteriales	Conexibacteraceae Parviterribacteraceae Solirubrobacteraceae
	Thermophilales	Thermophilaceae

**Figure 1.2.** Phylogénie des Actinobactéries élaborée à partir de l’outil « Taxonomy » d’après le site du NCBI (<https://www-ncbi-nlm-nih-gov.docelec.univ-lyon1.fr/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=201174> consulté le 04.09.2019)

Afin de faire évoluer cette classification basée sur le gène *rrs* et de délimiter de manière plus fiable certains complexes d'espèces, de nouveaux marqueurs moléculaires ont été proposés. Chez les Actinobactéries, on retrouve plusieurs marqueurs génétiques utilisés pour la classification et/ou l'identification de plusieurs genres. Par exemple, le gène *gyrB* qui code pour la sous-unité bêta de la protéine ADN gyrase, est impliqué dans la réplication du chromosome circulaire ainsi que d'autres mécanismes topologiques de l'ADN. Ce gène a déjà été décrit chez *Mycobacterium tuberculosis* et *Streptomyces coelicolor* comme une potentielle cible pour le développement de nouveaux antibiotiques. Son pouvoir discriminant important en a fait une bonne cible alternative au gène *rrs* (Madhusudan *et al.*, 1994 ; Musialowski *et al.*, 1994). Ce gène avait également été utilisé en complément de la DDH pour discriminer les genres *Rhodococcus* et *Nocardia* (Tancsics *et al.*, 2014 ; Takeda *et al.*, 2009). Le gène *rpoB* codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase, *i.e.* le complexe enzymatique responsable de la synthèse de l'acide ribonucléique, se montre très discriminant pour les *Mycobacterium* mais très peu résolutif pour les *Nocardia* (Miller *et al.*, 1994). Le gène *secA1* codant pour la pré-protéine ATPase translocase, *i.e.* qui permet l'export des protéines au travers de la membrane cytoplasmique de la bactérie, s'est également révélé très discriminant pour le genre *Nocardia*, en renfort des gènes *rrs* et *rpoB* pas complètement résolutifs pour certains espèces (Conville *et al.*, 2006). Enfin, le gène *sodA* codant pour la superoxyde dismutase qui intervient dans les mécanismes d'élimination des radicaux libres, *i.e.* un mécanisme de virulence et de défense de la bactérie, s'est aussi montré très résolutif pour le genre *Nocardia* tout comme le gène *secA1* (Sanchez-Herrera *et al.*, 2017). Cette liste n'est pas exhaustive et la littérature recense de nombreux autres marqueurs moléculaires ayant servi pour la classification des Actinobactéries (McTaggart *et al.*, 2010).

On peut également citer le gène *hsp65* qui est largement utilisé pour la classification des genres *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Gordonia*. Ce gène, codant pour une « heat shock protein » de 65 kDa, a été utilisé pour la première fois par Telenti *et al.*, (1993) afin d'identifier rapidement plusieurs espèces pathogènes de *Mycobacterium* en couplant une PCR sur ce gène à une analyse par restriction enzymatique (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP). L'avantage de cette technique était un résultat plus rapide et bien moins cher que le séquençage du gène *rrs* à cette époque. Aujourd'hui, avec la forte diminution des tarifs et des résultats obtenus plus rapidement, le séquençage de Sanger est effectué directement sur ce fragment (Kim & Shim, 2018).

Le séquençage d'un très grand nombre de gènes (généralement dans un but d'identification ou de classification plus fine en fonction des genres/gènes étudiés) a conduit à l'élaboration de bases de données disponibles pour l'ensemble de la communauté scientifique. L'une des plus connues d'entre elles est GenBank. Cette base de données est dite généraliste, *i.e.* qu'elle référence l'ensemble des séquences nucléotidiques qui lui sont envoyées, quel que soit le gène étudié. Elle comporte toutes les espèces bactériennes connues jusqu'à présent car l'ensemble des séquences permettant la description d'une nouvelle espèce doivent y être déposées. Une des richesses de cette base de données est la présence

également de génomes entiers et annotés, permettant ainsi d'atteindre une grande diversité de gènes (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Une autre base de données d'origine lyonnaise appelée BIBI (BioInformatic Bacterial Identification (<https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>)) a été construite et mise à disposition de la communauté scientifique. BIBI contient deux banques : une généraliste comportant l'ensemble de séquences existant pour toute bactérie publiée et une spécifique dédiée aux Actinobactéries d'intérêt médical. Ce projet a vu le jour au début des années 2000 pour fournir des séquences de qualité dans une démarche de diagnostic clinique (Devulder *et al.*, 2003). La banque spécialisée est constituée de séquences des gènes *rrs*, *hsp65*, *rpoB* et *sodA* pour les genres *Nocardia* et *Mycobacterium*. L'avantage de cette dernière par rapport à GenBank est qu'elle n'est composée que de séquences vérifiées selon des règles strictes (taille des fragments homogène et obtenus à partir des amorces TB11-TB12 (Telenti *et al.*, 1993) séquencées dans les deux sens et publiées dans des articles scientifiques). De ce fait, la qualité des séquences qui se retrouvent dans cette base de données est robuste et permet la réalisation d'analyses bio-informatiques de qualité à l'aide de ces données.

### 1.3. La bio-informatique au service de la taxonomie

Quelle que soit la cible génétique choisie, la PCR (Polymerase Chain Reaction, ou réaction en chaîne par polymérase) couplée à un séquençage de Sanger est une technique aujourd'hui largement répandue et permet d'obtenir des résultats robustes (Sánchez-Herrera *et al.*, 2017). Avec l'arrivée de la nouvelle génération de séquenceurs (NGS), nous pouvons maintenant soit séquencer un génome en entier (Tamura *et al.*, 2018), soit travailler avec un échantillon complexe contenant les ADN mélangés de plusieurs bactéries (Marti *et al.*, 2017). Ces techniques (MLSA, dDDH, ANI, métabarcoding) impliquent l'utilisation d'outils bio-informatiques puissants ainsi qu'un savoir-faire en traitement de big-data. Ces différents outils vont être présentés plus en détails dans les paragraphes qui suivent.

#### 1.3.1. La MLSA, un nouvel outil de classification des *Nocardia*

La MLSA (multilocus sequence analysis ou analyse de séquences multiloci en français) se base sur la variabilité présente à l'intérieur des gènes de ménage d'une même espèce bactérienne (variabilité infraspécifique) ou entre plusieurs espèces (variabilité interspécifique). Généralement, il y a une concaténation (*i.e.* un assemblage) de 4 à 6 gènes : les séquences d'intérêt sont débarrassées de leurs amorces puis concaténées (généralement entre 1500 et 2500 nucléotides) pour former un super-gène (McTaggart *et al.*, 2010 ; Sánchez-Herrera *et al.*, 2017). En effet, la concaténation de plusieurs gènes de ménage augmente le pouvoir discriminant et la robustesse d'une analyse phylogénétique (Devulder *et al.*, 2005). A la suite de cette concaténation, deux analyses sont possibles : (1) une analyse de similitude exprimée en pourcentage de similitude entre les séquences et représentée sous forme de matrice afin de comparer toutes les séquences entre elles. (2) une analyse phylogénétique qui



indique quelles sont les séquences les plus proches les unes des autres et représentée sous forme d'un arbre phylogénétique (Kumar *et al.*, 2016).

Les différentes étapes qui composent la MLSA sont les suivantes : (1) extraire les ADN génomiques et faire les PCR sur l'ensemble des gènes d'intérêt (cette liste de gènes aura été déterminée au préalable et varie d'un genre bactérien à l'autre en fonction du pouvoir discriminant des gènes utilisés) ; (2) séquencer les produits PCR ; (3) réaliser les analyses bio-informatiques : (i) assembler les deux sens de lecture des séquences, (ii) enlever les amorces, (iii) assembler les séquences des différents gènes, (iv) aligner les séquences et (v) faire l'analyse de diversité ou phylogénétique à l'aide d'un logiciel adéquat. La MLSA est une technique déjà largement répandue pour l'analyse de la diversité et l'identification de divers genres d'Actinobactéries tels que *Mycobacterium* ou *Nocardia* (McTaggart *et al.*, 2010; Sánchez-Herrera *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2016).

Cette analyse bio-informatique se base sur le principe de l'horloge moléculaire, c'est-à-dire que des gènes subissent forcément des mutations génétiques à une vitesse connue et stable (Roth *et al.*, 2003). Plus deux séquences seront différentes, plus leur dernier ancêtre commun sera éloigné dans le temps. Pour ce faire, il faut se baser sur des gènes de ménage. Sur le même principe que pour l'élaboration d'une phylogénie moléculaire basée sur un seul gène, différents algorithmes peuvent être utilisés afin de reconstruire les liens phylogénétiques entre les différentes souches étudiées. L'algorithme le plus largement répandu en phylogénie est le neighbor joining car c'est une méthode probabiliste qui travaille sur un échantillon de séquences afin de reconstituer les plus proches liens de parentés entre les séquences. Cet algorithme présente l'avantage de minimiser le temps de calcul de l'ordinateur, et donc permet aujourd'hui de faire des phylogénies à partir d'ordinateurs de bureaux conventionnels en quelques secondes (Saitou & Nei, 1987). Cet algorithme est généralement couplé à une correction Kimura-2-paramètres (K2P). Il est basé sur le principe de l'horloge moléculaire mais donne plus de poids aux transitions (transformation d'une purine en une autre purine ou une pyrimidine en une autre pyrimidine) qui sont plus souvent observées que les transversions (transformation d'une purine en pyrimidine ou inversement), contrairement au modèle Jukes-Cantor qui attribue le même poids aux deux mécanismes (Kimura, 1980). Enfin, un bootstrap est appliqué à ces analyses, *i.e.* une redondance du calcul, généralement entre 100 et 1000 fois (Felsenstein, 1985). Cela permet de donner des valeurs à chaque nœud phylogénétique. Par exemple, une valeur de 98 à un nœud phylogénétique indique que sur 1000 itérations, l'arbre est apparu avec ce nœud 980 fois et seulement 20 fois avec une autre configuration.

### 1.3.2. La dDDH, la nouvelle référence en taxonomie bactérienne ?

Le séquençage de génomes entiers a permis l'émergence de la dDDH (digital DNA-DNA hybridization). Cette technique, basée sur des outils bio-informatiques, permet une plus grande robustesse et répétabilité des résultats de DDH, tout en étant plus rapide et moins

chère. En effet, l'hybridation se fait *in silico*, *i.e.* qu'elle est numérique et se base sur les génomes, ce qui était demandé depuis longtemps par certains auteurs (Gevers *et al.*, 2005 ; Stackebrandt & Ebers, 2006). La DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, un organisme qui tient une collection reconnue de microorganismes) met à disposition un outil qui permet de calculer la distance entre deux génomes (GGDC, Genome-to-Genome Distance Calculator, <http://ggdc.dsmz.de/>). Les résultats obtenus sont tout à fait comparables à ceux obtenus par la DDH conventionnelle mais avec une meilleure robustesse et une plus grande répétabilité (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013). Comme pour la DDH, une valeur seuil est fixée à 70 % d'homologie entre deux génomes et moins de 1 % de différences de contenu en G+C des deux souches testées. Malheureusement, cette valeur de 70 % est fixée de manière quasi arbitraire et pourrait être amenée à varier d'un genre bactérien à un autre (Caumette *et al.*, 2016).

Cette technique est de plus en plus utilisée pour la détermination de nouvelles espèces. En 2014, l'espèce *Nocardia vulneris* a été déterminée à l'aide de cette technique couplée aux analyses traditionnelles de chimiotaxonomie et séquençage de l'ADN codant l'ARNr 16S (Lasker *et al.*, 2014). La DDH traditionnelle donnait des valeurs de  $72,5 \pm 5,0$  % tandis que la DDH digitale donnait des valeurs de  $65,8 \pm 2,8$  %. Les valeurs restent proches des 70 % mais sont sous cette valeur seuil, ce qui démontre la difficulté de fixer une valeur de manière arbitraire. La dDDH a été utilisée quelques années plus tard par Tamura *et al.*, (2018) qui ont séquencé 78 génomes de *Nocardia*. Les auteurs appellent à une évolution de l'étude taxonomique de ce genre bactérien. En effet, d'après eux, les anciens critères permettant de déterminer une nouvelle espèce ont permis l'émergence de « synonymes hétérotypiques », *i.e.* des doublons. D'après leurs analyses basées uniquement sur la dDDH et des valeurs fixées à 70 %, plusieurs espèces de *Nocardia* devraient être regroupées. Par exemple, pour sa détermination, *N. coublae* a été comparée à *N. ignorata* à partir des critères chimiotaxonomiques conventionnels ainsi que la DDH afin d'être décrite (Rodriguez-Nava *et al.*, 2007). Or Tamura *et al.*, (2018), sur la seule base de la dDDH, affirment que ces deux espèces ne sont en réalité qu'une seule. De même pour le complexe *N. soli/salmonicida/cummidelens* ou d'autres complexes de *Nocardia*.

### 1.3.3. L'ANI (Average Nucleotide Identity)

L'ANI (Average Nucleotide Identity) est une technique apparue peu de temps après la dDDH et se base sur le même principe, à savoir l'homologie entre deux séquences nucléotidiques (Goris *et al.*, 2007). Le principe ici est de mesurer la similarité des nucléotides au niveau génomique entre les régions codantes de deux génomes. Du fait de la forte variabilité à l'intérieur de cette séquence, les valeurs fixées ici pour la délimitation de deux espèces sont comprises entre 95 et 96 % (Kim *et al.*, 2014).

### 1.3.4. Etude des communautés bactériennes par métabarcoding

Une autre avancée technologique permise par le séquençage nouvelle génération (NGS) est le travail sur ADN complexe, *i.e.* que le séquençage n'est pas réalisé à partir d'un ADN issu d'une souche pure mais à partir d'un échantillon contenant les ADN d'une communauté microbienne entière (Deiner *et al.*, 2017). Ce séquençage massif, associé à des outils bio-informatiques puissants tels que la suite d'algorithmes gérée par *mothur* (un logiciel permettant l'analyse des séquences de communautés bactériennes (Schloss *et al.*, 2009)) ou *FROGS* (Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution (Escudié *et al.*, 2018)), permet de donner une image la plus exhaustive possible d'une communauté bactérienne, fongique ou de micro eucaryotes dans un environnement donné. Elle permet de s'affranchir des biais induits par les méthodes culturales et permet également la détection de séquences nucléotidiques de bactéries qui n'ont pour l'heure jamais été cultivées en laboratoire. En effet, on estime à l'heure actuelle que nous sommes capables de cultiver seulement 1 à 10 % de l'ensemble des bactéries présentes sur Terre (Stewart, 2012).

## 2. Ecologie des Actinobactéries

### 2.1. Les Actinobactéries dans l'environnement naturel

Les Actinobactéries sont très présentes dans l'environnement avec, si l'on prend l'exemple du sol, des densités bactériennes aux alentours de  $10^6$  à  $10^9$  UFC/g de sol sec alors qu'on estime qu'un seul gramme de sol peut contenir jusqu'à  $10^8$ - $10^9$  UFC de bactéries (Raynaud & Nunan, 2014). Le genre *Streptomyces* est le plus abondant car on estime qu'il représente 95% de la population d'Actinobactéries des sols (Goodfellow & Williams, 1983). Cependant, ces valeurs sont très variables en fonction des environnements pédologiques (nature du sol, taux de matière organique, pH optimal entre 6 et 9). La température, optimale entre 25 et 30 °C, joue également un rôle très important dans les variations d'abondance en Actinobactéries. En effet, Hiltner & Störmer (1903) ont démontré de grosses variations saisonnières d'abondance avec 20 % de la communauté bactérienne totale représentée par les Actinobactéries au printemps, contre 30% en automne car il y a plus de matière organique disponible, et seulement 13 % en hiver. Enfin, l'humidité joue également un rôle important car une humidité trop forte inhibe grandement leur croissance, tandis qu'une bonne humidité permet la germination des spores (pour les genres qui sporulent) (Barka *et al.*, 2016).

Habitantes du sol où elles occupent un rôle important dans les mécanismes de minéralisation de la matière organique (*e.g.* *Streptomyces* et *Gordonia*), ubiquitaires et cosmopolites, les Actinobactéries représentent un phylum bactérien incontournable de notre monde grâce à leur implication dans de nombreux processus aussi bien naturels qu'industriels. On les retrouve associées à des hôtes humains/animaux ou végétaux dans le cas de genres pathogènes (*e.g.* *Mycobacterium* ou *Nocardia*), en symbiose avec des plantes comme *Frankia* et son hôte l'aulne ou commensales du tube digestif humain pour les *Bifidobacterium* (Barka *et al.*, 2016).

La plupart des Actinobactéries sont des saprophytes, *i.e.* qu'elles se nourrissent de matière organique en décomposition, essentiellement de la cellulose et de la chitine (Groom, 1894). De ce fait, elles sont principalement retrouvées dans le sol, mais elles sont également présentes dans tous les autres environnements : eaux douces et salées, à plusieurs mètres de profondeur ou dans des grottes, dans les tissus humains, animaux et végétaux et même dans l'air (Barka *et al.*, 2016).

### 2.2. Les Actinobactéries et les environnements urbains

La ville, en concentrant de fortes activités humaines (logements, transports) et industrielles, est un lieu où sont produits et s'accumulent de très nombreux polluants, aussi bien chimiques (*e.g.* hydrocarbures, pesticides, gaz de combustion) que biologiques (*e.g.* matière organique, contamination fécale, pathogènes humains). Dans cet environnement particulier, les Actinobactéries sont très représentées du fait de leur capacité à dégrader les hydrocarbures et les pesticides (Quatrini *et al.*, 2008), et de leur résistance aux métaux lourds (Alvarez *et al.*, 2017). D'un point de vue fonctionnel, ces composés chimiques sont une sorte de « matière organique » pour les Actinobactéries (source de carbone et d'azote) qui sont capables de les assimiler à leur métabolisme, de les dégrader et donc de les utiliser comme source d'énergie. Leur présence a donc été rapportée à plusieurs reprises dans des environnements urbains pollués (Marti *et al.*, 2017 ; Sébastien *et al.*, 2014). Cette capacité à résister à de nombreux polluants peut aussi être attribuée à leur métabolisme secondaire très important. En effet, en phase stationnaire de croissance, de très nombreuses Actinobactéries synthétisent des composés leur permettant de mieux résister aux environnements contraints, d'avoir un avantage sélectif par rapport aux autres phyla bactériens ou fongiques en environnement limitant.

### 2.3. Pollution de l'eau liée à l'activité humaine

En ville, lors d'un événement pluvieux, la pluie se charge en micropolluants au cours de son cheminement sur le sol jusque dans les bouches d'égouts. Deux types de micropolluants sont retrouvés, minéraux ou organiques. Les premiers regroupent essentiellement ce que l'on appelle plus communément les éléments traces métalliques (ETM) ou métaux lourds tels que le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le plomb (Pb) le cadmium (Cd) ou encore le mercure (Hg). Ils sont principalement issus de la dégradation des infrastructures routières, électriques, des toitures ou encore de l'usure des pneumatiques et des plaquettes de freins. Les micropolluants organiques sont généralement des produits issus de l'industrie pétrochimique (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychlorobiphényles (PCB) ou pesticides) mais également de phénomènes naturels comme la combustion du bois ou le volcanisme (Chocat, 1997).

En plus de ces deux types de polluants, la pollution microbiologique est un sujet préoccupant pour la santé humaine. En effet, depuis longtemps les coliformes et les

entérocoques sont suivis comme indicateurs de pollution fécale aussi bien animale qu'humaine dans les réseaux hydriques (Boukerb *et al.*, 2015). Ces microorganismes sont notamment très recherchés dans les aliments et l'eau car ils comprennent de nombreux microorganismes d'origine fécale et sont des marqueurs de l'hygiène des aliments et de l'eau. Ils sont considérés comme des organismes modèles car leur présence est indicatrice d'autres pathogènes tels que *Klebsiella pneumoniae* ou *Enterobacter cloacae* (Mishra *et al.*, 2018). Depuis quelques années, d'autres bactéries commencent à être étudiées comme étant des indicateurs de pollution microbiologique corrélée à une contamination chimique spécifique. Par exemple, Marti *et al.*, (2017) ont réalisé un suivi de certains genres pathogènes tels que *Pseudomonas*, *Aeromonas* et *Acinetobacter* dans une rivière intermittente péri-urbaine fortement contaminée par l'activité humaine. Ils n'ont pas pu faire de corrélation entre la présence de ces trois indicateurs bactériens avec les coliformes malgré la présence de ces derniers tout au long de la rivière. Dans la zone géographique étudiée, aucune maladie liée à des coliformes n'avait été recensée alors que celles dues aux trois genres bactériens précédemment cités commencent à être de plus en plus préoccupantes (folliculite, kératite, otites, pneumopathies...) (Boukerb *et al.*, 2015).

Des travaux de notre équipe de recherche ont déjà été menés sur les contaminants microbiologiques présents dans le cycle de l'eau en ville. Bernardin-Souibgui *et al.*, (2018) y ont notamment retrouvé de grandes quantités de bactéries indicatrices de pollution fécale, mais également des *Nocardia farcinica* et *N. cyriacigeorgica*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas caviae*. Les *Nocardia* ont été fortement retrouvées dans la chambre de décantation d'un bassin de rétention, *i.e.* le lieu où la matière en suspension fortement polluée se dépose. Voisin *et al.*, (2017) se sont quant à eux intéressés plutôt au compartiment infiltration et nappe phréatique du bassin Django-Reinhardt qui sera présenté plus en détails par la suite, ainsi que d'autres bassins d'infiltration de l'agglomération lyonnaise. Ils ont déterminé qu'il n'y avait qu'une faible infiltration des bactéries présentes à la surface du bassin Django-Reinhardt vers la nappe phréatique mais ne peuvent pas exclure une potentielle contamination des eaux souterraines par ces microorganismes.

### 2.4. Le cas particulier de la gestion des eaux pluviales en environnement urbain

En France, la question de la gestion des eaux usées et pluviales a longtemps été un problème d'hygiène. En effet, les habitants des villes ont souffert de nombreuses maladies, notamment les deux épidémies de choléra à Paris au XIX<sup>ème</sup> siècle liées à des problèmes de contamination de l'eau potable par les eaux usées. De là, la nécessité d'hygiène est devenue grandissante, ce qui a permis d'aboutir au réseau d'assainissement moderne en 1894 lors du vote de la loi sur le tout-à-l'égout à Paris (Chocat, 1997).

Au lendemain de la Seconde Guerre Mondiale, la révolution agricole et le baby-boom firent exploser la démographie française. En même temps, l'exode rural eut pour conséquence une forte hausse de la population en ville. Cette urbanisation eut pour effet, en plus d'une

forte augmentation de la production d'eaux usées, une artificialisation et une imperméabilisation des sols, perturbant ainsi le cycle naturel de l'eau en ville. Le système du tout-à-l'égout, jusqu'alors très performant, se mit à montrer ses limites. Le réseau était largement surdimensionné à ses débuts, mais l'étalement des villes et les nombreux branchements anarchiques sur ce réseau l'ont rapidement saturé. Les centres villes historiques se trouvant généralement en contrebas de l'ensemble de la commune (puisque'ils sont au bord du cours d'eau dans lequel se déversent les exutoires), chaque pluie un peu soutenue conduisait à des inondations. Face à ces problèmes récurrents, de nouveaux aménagement des réseaux d'eaux usées ont dû être repensés (Azzout et al., 1993).

En plus de ces problèmes de gestion des eaux usées et pluviales, le système du tout-à-l'égout induit un déficit de recharge/alimentation naturelle de la nappe phréatique en perturbant le cycle naturel de l'eau du fait de l'imperméabilisation des surfaces. A cela s'ajoutent les importants volumes d'eau pompés dans cette même nappe phréatique pour les besoins de la ville (climatisations urbaines, systèmes de refroidissement, parking souterrains...). Ces deux points induisent un fort stress hydrique sur la nappe phréatique qui ne peut plus se recharger convenablement (Azzout et al., 1993). Il a donc fallu repenser entièrement la gestion des eaux usées en ville.

Dans les 1950-60, ces constats alarmants ont mené à la création d'une nouvelle discipline scientifique, l'hydrologie urbaine. Elle a « *pour objet l'étude de l'eau et de ses relations avec les différentes activités humaines en zone urbaine. Elle traite tout particulièrement des relations entre la gestion des eaux de surface et l'aménagement de l'espace en milieu urbain.* » (Chocat, 1997).

A l'heure actuelle, on distingue deux types d'installations pour l'évacuation des eaux usées et pluviales en fonction de la taille et des moyens financiers dont disposent les villes pour gérer leur assainissement (Chocat, 1997) :

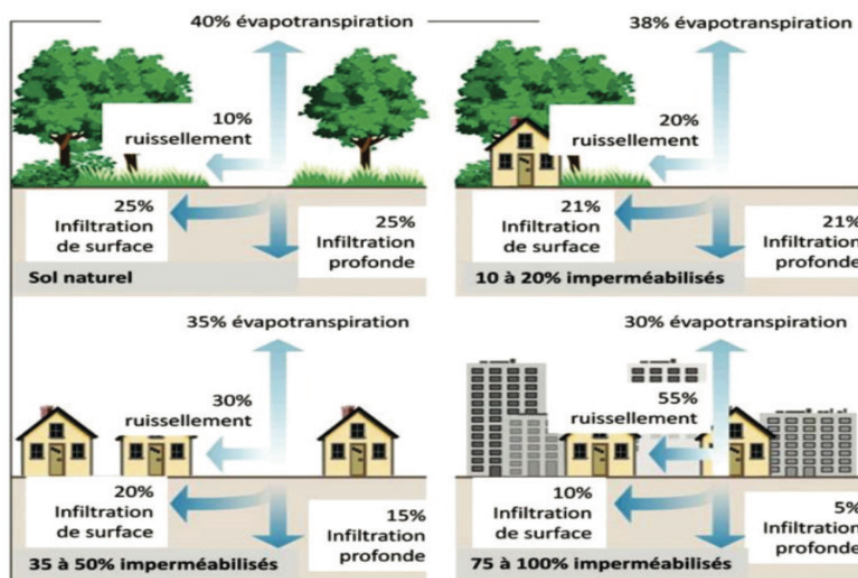
1) Le **réseau unitaire** qui est le plus répandu, mais également celui qui pose le plus de problèmes. En effet, ici les eaux usées (*i.e.* eaux qui sortent de nos cuisines, salles de bains, toilettes) sont collectées avec les eaux de pluie et sont traitées dans les stations d'épuration (STEP). Or, les eaux usées ont un débit relativement constant et prévisible, ce qui n'est pas le cas des eaux pluviales. En cas d'orage important, les STEP vont rapidement être saturées. Pour éviter tout débordement, une partie des eaux non traitées est directement déversée dans la nature au niveau de « déversoirs d'orages », entraînant ainsi une pollution aussi bien chimique que microbiologique de l'environnement récepteur.

2) Le **réseau séparatif** est quant à lui plus adapté aux aléas de la météo. En effet, ici deux réseaux sillonnent la ville. Un réseau qui collecte les eaux usées pour les acheminer vers les STEP, et un réseau entièrement dédié aux eaux de ruissellement. L'exutoire final de ce deuxième réseau est généralement le bassin d'infiltration qui va permettre une recharge



efficace de la nappe phréatique. Cependant, d'autres techniques d'infiltration sont possibles. L'ensemble des solutions pour traiter les eaux de pluie sont dites « alternatives » car en opposition au traitement en STEP.

En 2015, près de 80 % de la population française vivait en zone urbaine (Bernardin-Souibgui *et al.*, 2017b). Cette forte concentration de la population nécessite de nombreux aménagements qui perturbent le cycle naturel de l'eau en ville. Dans un écosystème non anthropisé tel qu'une prairie, lors d'une pluie, 50 % de l'eau est directement infiltrée dans le sol tandis que 40 % sont évapotranspirés et seulement 10 % ruissellent. Dans le cas d'un environnement fortement imperméabilisé, l'infiltration ne représente plus que 15 % et l'évapotranspiration 30 % puisqu'il y a moins de végétaux. Le ruissellement est quant à lui bien plus important car il peut représenter jusqu'à 55 % des flux d'eau (Figure 2.1) (Chocat *et al.*, 2015). Ceci illustre bien la nécessité de réintégrer l'eau dans son cycle naturel en ville.



**Figure 2.1.** Relations entre l'imperméabilisation des sols et les différents modes d'évacuation des eaux pluviales. (D'après le site <http://graie.org/eaumelimelo/>)

#### 2.4.1. Les techniques alternatives de gestion des eaux pluviales

Le terme « alternatif » désigne le fait que les eaux pluviales ne soient plus acheminées avec les eaux usées *via* le réseau unitaire vers une station d'épuration, mais soient acheminées par un réseau « séparatif » vers des ouvrages permettant leur infiltration vers les aquifères. Le but étant de se rapprocher le plus possible du cycle naturel de l'eau, *i.e.* continuer à utiliser aux mieux le cheminement que prenait l'eau avant l'urbanisation. En somme, retarder le transfert d'eau vers les exutoires de surface (*e.g.* les cours d'eau) et accélérer son évacuation vers les exutoires souterrains (Azzout *et al.*, 1993). Ces techniques, généralement considérées comme moins onéreuses et plus efficaces que l'assainissement traditionnel par réseau, permettent également le développement de nouveaux espaces naturels en ville (Chocat, 1997). Parmi les structures mises en place, on retrouve notamment les rivières sèches (Figure

**2.2 A**), les tranchées drainantes (**Figure 2.2 B**), les noues végétalisées (**Figure 2.2 C**), des terrains de football inondables en cas de forte pluie (**Figure 2.2 D**), les bassins de rétention à sec (**Figure 2.2 E**) ou en eau (*i.e.* lac artificiel (**Figure 2.2 F**)), les bandes végétalisées (**Figure 2.2 G**), ou encore les conduites stockantes/drainantes (**Figure 2.2 H**). Ces techniques sont applicables aussi bien dans les zones d'urbanisation nouvelles que dans les centres villes anciens ([Azzout et al., 1993](#)).

Lorsque ces techniques alternatives ont été mises en place, les eaux de pluies étaient considérées comme étant propres puisqu'elles venaient du ciel. Elles n'étaient donc pas souillées en comparaison aux eaux qui transitent par nos logements et qui nécessitent un traitement avant leur rejet dans les cours d'eau (essentiellement afin de diminuer leurs taux de matière organique). Il a donc été décidé de rejeter cette eau directement dans l'environnement de différentes manières. Deux grands systèmes peuvent être opposés : (i) le rejet en surface, *i.e.* dans un cours d'eau le plus généralement et (ii) l'infiltration par les différents procédés cités précédemment. Cette deuxième technique, bien que plus complexe à mettre en place par rapport à la première (un simple tuyau qui débouche dans une rivière), présente deux grands avantages. En effet, (a) l'infiltration des eaux pluviales permet de recharger efficacement et en quantité la nappe phréatique, phénomène rompu par l'imperméabilisation des sols. De plus, (b) la zone vadose, *i.e.* la zone non saturée de la nappe phréatique permet de filtrer l'eau et de l'en débarrasser de toutes les particules de pollution dont elle a pu se charger au cours de son trajet de l'atmosphère jusqu'à l'exutoire final ([Chocat, 1997](#)).

A Lyon, une structure a vu le jour afin d'étudier et de promouvoir l'hydrologie urbaine. L'OTHU (Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine) a été créé en 1999 et fédère les laboratoires et équipes de recherche appartenant à neuf établissements lyonnais (BRGM, Cemagref Lyon, Ecole Centrale de Lyon, ENTPE, INSA de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université Lumière Lyon 2, Université Jean Moulin Lyon 3, VetAgro Sup) spécialisés dans des domaines très variés (biologie, climatologie, chimie, économie, hydrologie, hydraulique, hydrogéologie, santé, sociologie...). Le groupement bénéficie notamment du soutien du Grand Lyon et de l'Agence de l'Eau. Ce conglomerat a pour objectif scientifique l'amélioration des connaissances sur les risques d'inondation et de pollution provoqués par les rejets urbains de temps de pluie, aux volumes d'eau et aux charges de polluants rejetés en milieu urbain, ainsi qu'à leur impact sur les systèmes naturels ([GRAIE, 2007](#)).

Le GRAIE (Groupe de Recherche Rhône-Alpes sur les Infrastructures et l'Eau) est quant à lui un groupe de chercheurs, de représentants de l'Etat, de collectivités territoriales, de bureaux d'études, d'entreprises de réalisation et de fournisseurs de matériaux. Il a pour vocation de diffuser les connaissances disponibles (notamment celles produites dans le cadre de l'OTHU) et de suivre des expériences réalisées dans le domaine ([Azzout et al., 1993](#)).





**Figure 2.2.** Aménagements urbains permettant l'infiltration des eaux pluviales. A) rivière sèche, B) tranchée drainante, C) noue végétalisées, D) terrain de football, E) bassin d'infiltration, F) lac artificiel, G) bande végétalisée et H) buse drainante.

Crédits photos : A-C Hélène Bouteiller (Stagiaire M2 2017), D-E <http://www.graie.org/>, F-G <https://www.grandlyon.com/>, H <https://www.tubosider.fr/>.

#### **2.4.2. Les bassins d'infiltration**

Le bassin d'infiltration est un bassin de retenu qui permet le stockage temporaire des eaux pluviales et qui assure également l'infiltration de cette eau dans le sol. Trois types de bassins se distinguent :

- Les premiers construits dans les années 1950 et qui permettent simplement d'augmenter le niveau piézométrique des nappes d'eau potable,
- Ceux construits dans les années 1970 qui ont une fonction d'infiltration exclusivement. Ils sont souvent accusés de prendre de la place foncière dans des zones de forte demande et son peu esthétiques,
- Ceux de dernière génération qui allient infiltration et côté récréatif/paysager. De ce fait, ils sont mieux perçus par les populations avoisinantes et sont généralement mieux entretenus ([Chocat, 1997](#)).

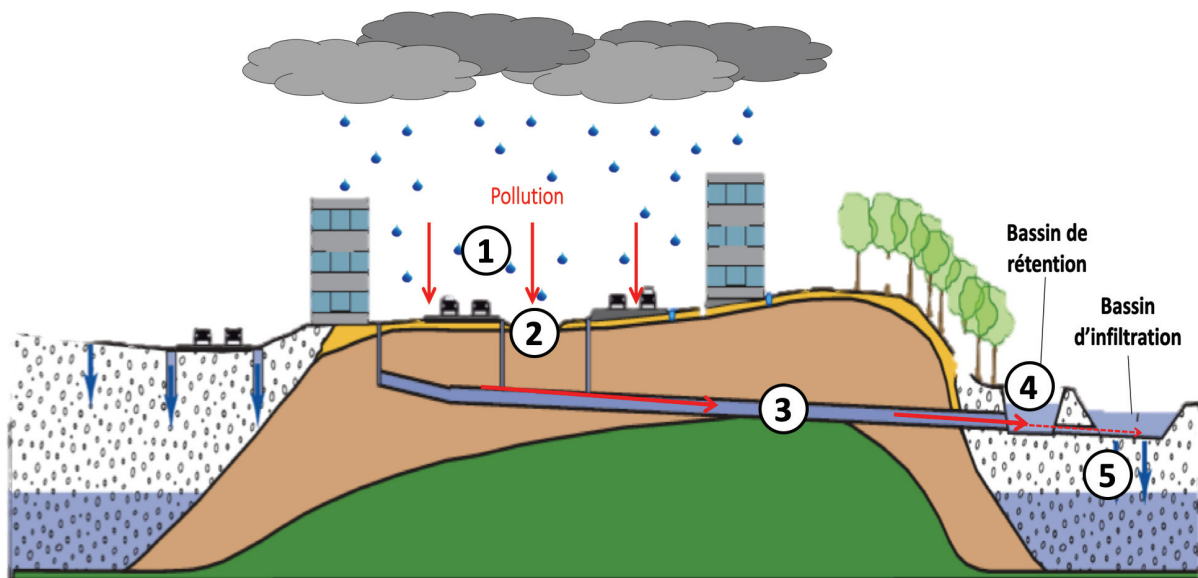
Le bassin d'infiltration est la technique « alternative » la plus largement répandue dans la gestion des eaux pluviales. Il possède l'avantage de traiter de grands volumes d'eau en une surface très réduite. Cela permet de contourner les problèmes liés à l'imperméabilisation des sols par l'urbanisation en (i) collectant les eaux de pluie/ruissellement, (ii) rechargeant de manière artificielle la nappe phréatique et enfin (iii) en réduisant la pollution urbaine sur le milieu aquatique car la plupart des polluants (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), pesticides, éléments traces métalliques (ETM), polychlorobiphényles (PCB), antibiotiques...) ([Pitt et al., 1999](#), [Grebel et al., 2013](#)) sont sous forme particulaire et restent adsorbés sur les 30 premiers centimètres de sol ([Dechesne et al., 2003](#)). Les poussières, sables et matières organiques charriés par les eaux pluviales jusque dans le bassin d'infiltration représentent de gros volumes. En effet, [Fuchs et al., \(2004\)](#) ont rapporté des taux de matière en suspension entre 50 et 1000 mg/L pour un bassin versant urbain. Cette matière en suspension forme une couche de sédiments urbains appelée anthroposol ou technosol ([Bedell et al., 2013](#)).

Afin d'augmenter l'efficacité du bassin d'infiltration, un bassin de rétention peut être placé en amont. Il permet le stockage d'un volume supplémentaire d'eau mais surtout des particules issues de la ville qui sédimentent dans ce premier bassin, permettant ainsi de limiter le colmatage du bassin d'infiltration ([Barraud et al., 2002](#)).

La **figure 2.3** présente le principe de fonctionnement d'un bassin d'infiltration couplé à un bassin de rétention. Lors d'un événement pluvieux, (1) les précipitations se chargent en polluants dans l'air (environ 15-25 % de la pollution) et par lessivage des sols (les 75-85 % restants). (2) Cette eau de ruissellement, polluée par l'activité humaine, est collectée le plus souvent dans un réseau séparatif (*e.g.* les bouches d'égouts) puis (3) est envoyée plus loin pour être infiltrée. Le bassin de rétention (4) fait cheminer l'eau de manière à ce que sa vitesse d'écoulement soit fortement ralentie afin de faire sédimenter les plus grosses particules



contenues dans l'eau (taille supérieure à 200  $\mu\text{m}$ ). Un dégraisseur peut également être présent afin d'éliminer les huiles minérales qui sont une forte source de pollution. Cependant, cette partie permettant la rétention n'est pas toujours présente et l'eau peut arriver directement dans le bassin d'infiltration. Enfin, (5) l'eau arrive dans le bassin d'infiltration où elle va percoler petit à petit dans le sol. Les couches de sols qui vont être traversées permettent la filtration de l'eau et donc sa dépollution. Plus la couche de sol à traverser est importante, plus la filtration est efficace. C'est un paramètre important à prendre en compte lors de la construction d'un bassin d'infiltration. Si la nappe phréatique est trop proche de la surface du bassin, alors la dépollution de l'eau ne sera pas optimale ([Thèse Gautier, 1998](#)).



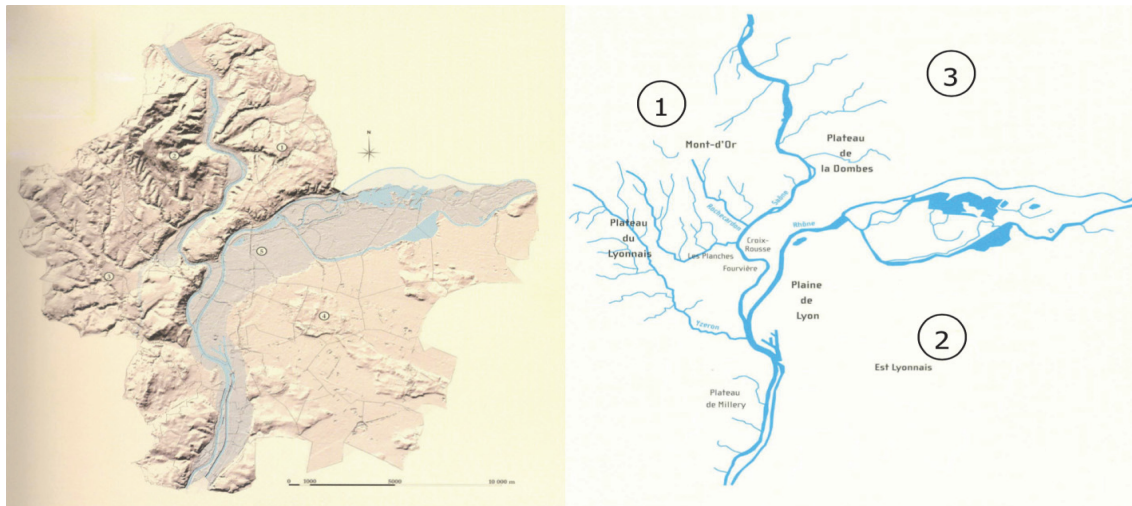
**Figure 2.3.** Gestion des eaux pluviales à Lyon (Schéma adapté du rapport Gessol ([Winiarski et al., 2015](#)))

Si les bassins d'infiltration se sont si largement imposés dans le paysage hydraulique des villes françaises, c'est parce qu'ils présentent de nombreux avantages. En effet, ils permettent de réduire considérablement les effets de l'urbanisation sur le cycle de l'eau en ville notamment en :

- Réduisant les débits de pointe et les volumes d'eau aux exutoires, limitant ainsi les inondations,
- Réduisant la pollution liée au lessivage des surfaces en retenant les polluants *via* des processus bio-physico-chimiques,
- Rechargeant la nappe phréatique qui est souvent largement sollicitée pour les usages de la ville,
- Réduisant les coûts d'urbanisation, par exemple en permettant d'assainir des zones éloignées des exutoires traditionnels,
- Contribuant à l'optimisation de l'espace urbain ([Gonzalez-Merchan et al., 2012](#)).

### 2.4.3. Spécificité de l'agglomération lyonnaise

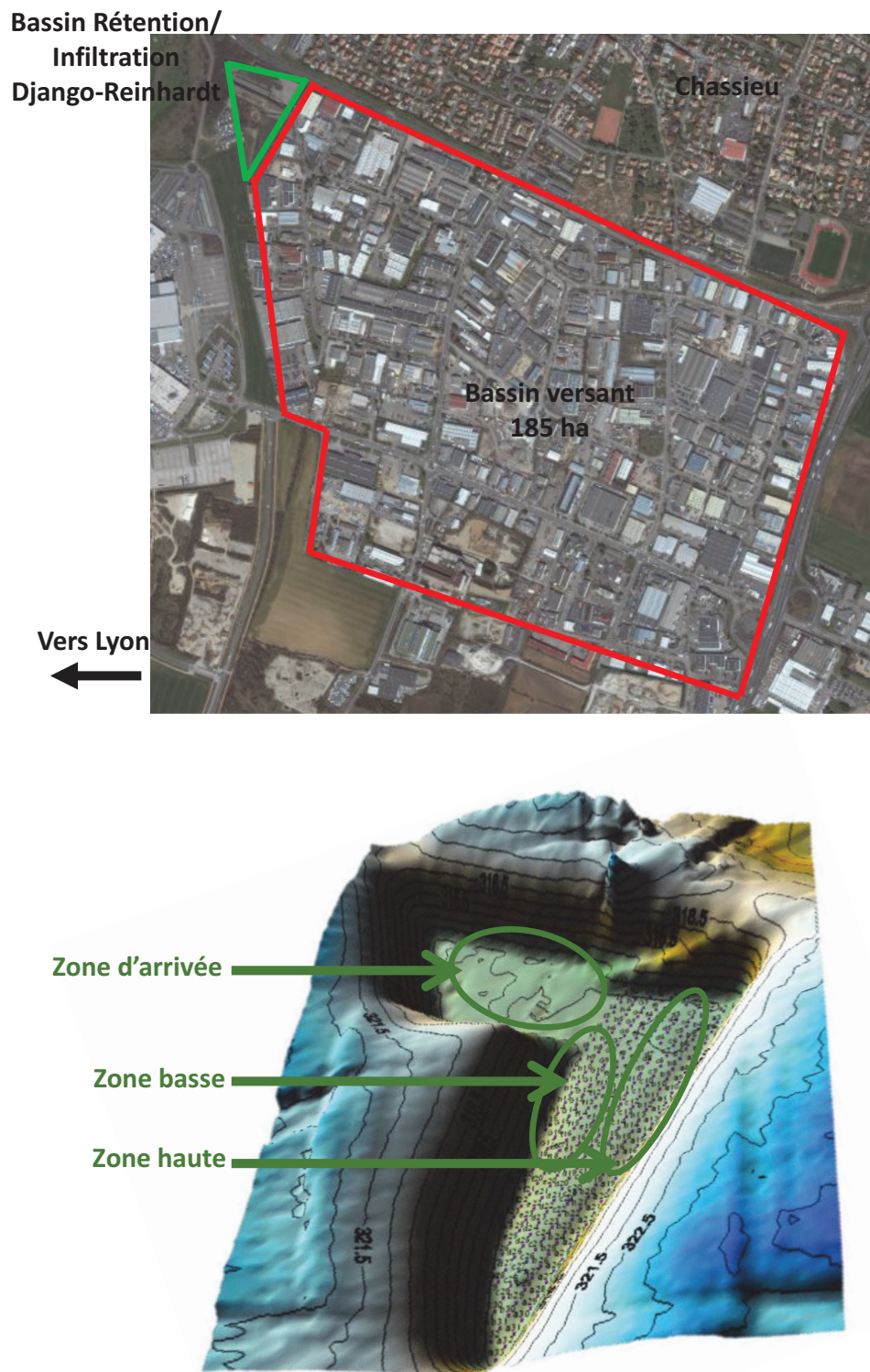
Dans l'agglomération lyonnaise, les bassins d'infiltration se situent principalement dans la partie Est du territoire (Datry *et al.*, 2003 ; Winiarski *et al.*, 2013). En effet, comme nous pouvons le voir sur la **figure 2.4**, la topographie de la région ne permet pas l'infiltration dans les Monts d'Or (1), *i.e.* l'Ouest lyonnais, car il n'y a que peu de roches perméables. Ceci explique d'ailleurs la présence des nombreux cours d'eaux qui jalonnent le secteur. Au Nord-Est (3), la roche est plus perméable mais la nappe phréatique est proche de la surface, ce qui est très visible au niveau des nombreux étangs présents dans la Dombes. Enfin, au Sud-Est de l'agglomération (2) se situe une épaisse couche d'alluvions fluvio-glaciaires du quaternaire qui permet un très bon drainage et la présence d'immenses nappes phréatiques à quelques mètres de profondeur. Nous retrouvons ici les conditions optimales pour l'installation de bassins d'infiltration (Thèse Datry, 2003).



**Figure 2.4.** Topographie et hydrologie de la région lyonnaise (D'après « Les ressources en eau de la région lyonnaise » de Robert Jonac)

### 2.4.4. Le bassin d'infiltration Django-Reinhardt

Le bassin d'infiltration Django-Reinhardt est situé sur la commune de Chassieu dans l'Est lyonnais. Il a été construit en 1975 par la Communauté Urbaine de Lyon (COURLY) pour recueillir les eaux pluviales de la zone industrielle de Chassieu (**Figure 2.5**). Son nom est tiré du célèbre musicien de jazz manouche du même nom car un campement de la communauté de ce musicien est installé à proximité du bassin. Le bassin a été réhabilité en 1985 puis en 2002 afin d'être instrumenté par l'OTHU pour une durée initiale de 10 ans. Le but était d'évaluer l'impact d'un bassin d'infiltration sur le sol et les eaux de la nappe phréatique sous-jacente. Il est depuis monitoré sur de nombreux paramètres physico-chimiques tels que la pluviométrie, le débit d'eau, le pH, la conductivité électrique, la turbidité... (Barraud *et al.*, 2002). Cette forte instrumentation en a fait un modèle d'étude pour les laboratoires qui travaillent en collaboration étroite avec l'OTHU.



**Figure 2.5.** Bassin versant recueillant les eaux pluviales collectées par le bassin de rétention/infiltration Django-Reinhardt et topographie du bassin d'infiltration

Le bassin d'infiltration est situé au-dessus de l'aquifère « nappe de l'Est lyonnais – nappe d'accompagnement du Rhône ». Cette nappe phréatique, d'une surface de 200 km<sup>2</sup>, comprend trois corridors constitués d'alluvions fluvioglaciaires très perméables ( $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  m.s<sup>-1</sup>) qui sont séparés par des buttes morainiques à faible perméabilité ( $10^{-5}$  à  $10^{-8}$  m.s<sup>-1</sup>). L'épaisseur de la couche d'alluvions fluvioglaciaires et donc la zone non saturée (zone vadose) décroît d'Est en Ouest allant de plus de 40 m d'épaisseur au large de la ville, à seulement 4 m aux portes de Lyon (Thèse Datry, 2003).

D'une surface de 2 ha, le bassin collecte les eaux pluviales et de process (e.g. eaux de refroidissement) d'un bassin versant d'une surface de 185 ha imperméabilisé à 75 %. Le bassin de rétention possède une capacité de 32.000 m<sup>3</sup> contre 61.000 m<sup>3</sup> pour le bassin d'infiltration. Ce bassin, comme tous ceux de l'Est lyonnais, se situe sur une couche d'alluvions fluvioglaciaires du quaternaire permettant une bonne conductivité hydraulique (Barraud *et al.*, 2002). La nappe phréatique se situe à 13 m sous la surface du bassin d'infiltration, ce qui est considéré comme suffisant pour le processus de dépollution de l'eau (Thèse Gautier, 1998).

Le ruissellement de l'eau de pluie en ville entraîne avec lui de forts taux de matières en suspension riches en matière organique mais également en polluants organiques de type HAP ou inorganiques tels que les éléments traces métalliques comme le zinc (Zn), le cuivre (Cu) ou le cadmium (Cd) (Winiarski *et al.*, 2006 ; Thèse Badin, 2009). Lassabatère *et al.*, (2007) ont démontré que les ETM présents à la surface du bassin d'infiltration ne s'infiltraient pas dans le sol de manière homogène. En effet, les alluvions fluvioglaciaires qui constituent le sol du bassin d'infiltration sont très riches en carbonates. Or, les ETM ont des affinités différentes avec ces carbonates. Le plomb (Pb), par exemple, présente une faible solubilité avec les carbonates (*i.e.* le plomb précipite) tandis que les autres éléments tels que le zinc ou le cadmium cristallisent avec les ions carbonates. De ce fait, le plomb s'infiltre plus en profondeur que les autres éléments qui sont retenus à la surface. Le zinc et le cadmium sont quant à eux retenus aux mêmes concentrations dans ce sol alors qu'ils présentent habituellement des constantes de solubilité différentes. En revanche, au-delà de 30 cm de profondeur, on ne retrouve quasiment plus de polluants, sauf les HAP qui par leurs propriétés hydrophobes peuvent pénétrer un peu plus en profondeur dans la couche de sol (Thèse Dechesne, 2003). Ces observations ont été réalisées 14 ans après la mise en service du bassin d'infiltration, ce qui démontre une capacité de filtration des eaux pluviales sur le long terme. Le bassin devrait donc rester pleinement fonctionnel encore de nombreuses années (Thèse Dechesne *et al.*, 2003).

Ces matières en suspension, en plus de représenter une importante source exogène de polluants, sont également un fort apport en matière organique formant une couche de sédiments urbains (Bedell *et al.*, 2013). Lecoustumier *et al.*, (2008) estiment à 1 mm/an le taux de dépôt de ces sédiments à la surface de l'ensemble du bassin d'infiltration Django-Reinhardt. Ces sédiments réduisent les capacités locales d'infiltration d'eau dues à leur faible conductivité hydraulique (Lassabatère *et al.*, 2010), phénomène très marqué dans la zone



d'arrivée du bassin (Dechesne *et al.*, 2005). À terme, ce colmatage réduit considérablement les capacités d'infiltration, ce qui augmente le temps de ressuyage du bassin, *i.e.* le temps nécessaire pour que le bassin d'infiltration se vide intégralement de son eau. Même si la couche de sédiments limite l'infiltration des polluants qui parviennent dans le bassin, les gestionnaires doivent trouver un équilibre entre réduction de la pollution par cette couche de sédiments et colmatage du bassin par ces mêmes sédiments (Lassabatère *et al.*, 2010).

Les sédiments urbains, de par leur forte teneur en matière organique, sont également responsables de la croissance spontanée d'une végétation assez variée avec 58 espèces végétales inventoriées (Saulais *et al.*, 2011). Ces auteurs ont identifié trois zones distinctes dans le bassin en fonction de la végétation spontanée qui s'y développe : une zone d'arrivée (*Typha latifolia*, roseau à massette), une zone proche de la première et encore très humide (*Phalaris arundinacea*, alpestre faux-roseau) et une zone plus éloignée et plus sèche (*Eleocharis palustris*, scirpe des marais). Bedell *et al.*, (2013) ont démontré que la végétation et la zonation du bassin n'avaient pas d'impact sur certains paramètres physico-chimiques tels que K, Mg, Ca, Al, Fe, le pH, les teneurs totales en azote et phosphore tandis que d'autres sont influencés par la différence de végétation (ETM, teneur en matière organique, texture, ions sulfates et nitrates). Gonzalez-Merchan *et al.*, (2014), sur la base de ces travaux, ont évalué l'impact de la végétation sur le colmatage du bassin. Il en ressort que la végétation a un effet positif sur l'infiltration car les racines des végétaux, lors de leur croissance, produisent des chemins préférentiels pour l'écoulement de l'eau à travers les sédiments. Le *Phalaris arundinacea*, avec ses grandes racines, est plus efficace pour la création de flux préférentiels d'infiltration que le *Rumex crispus* (l'oseille crêpue). En hiver, la décomposition des végétaux entraîne une augmentation de la matière organique dans la couche de sédiments, augmentant ainsi le colmatage du bassin (Gonzalez-Merchan *et al.*, 2014).

Cependant, même si la végétation peut être perçue comme une alliée de l'infiltration, il faut tout de même se méfier des plantes qui auraient un système racinaire trop profond comme les arbres. En effet, si les chemins préférentiels créés par les racines pour l'infiltration sont trop importants, cela peut résulter en une diminution de la capacité de filtration de la zone vadose et donc possiblement une pollution de la nappe phréatique si les polluants n'ont pas été retenus en surface (Winiarski *et al.*, 2013). La nature du sol (texture sableuse ou graveleuse) a également une influence sur les transferts préférentiels de solutés dans la zone vadose. L'hétérogénéité des sédiments ainsi que leurs propriétés hydrauliques peuvent donc conduire à des flux préférentiels et ainsi diminuer la capacité de filtration du bassin (Winiarski *et al.*, 2013).

Foulquier *et al.*, (2009) ont quant à eux travaillé sur l'influence du carbone organique dissout qui parvient dans les nappes phréatiques sur la biomasse du compartiment microbien. Malgré les importants flux d'eau infiltrés, le taux de carbone organique dissout assimilable par les microorganismes reste faible, ce qui ne modifie que très peu la composition de la communauté microbienne. Ces perturbations environnementales empêchent l'établissement

de colonies d'invertébrés dans ces systèmes aquatiques. Voisin *et al.*, (2018) ont continué dans ce sens, ce qui a permis de mettre en évidence que la hauteur de la zone vadose (*i.e.* zone non saturée) avait une influence sur les transferts de carbone organique dissout ainsi que sur les communautés bactériennes qui peuvent être mobiles. Il en résulte qu'une zone non saturée d'une hauteur d'un mètre seulement est aussi efficace qu'une hauteur de 13 m pour limiter la contamination de la nappe phréatique par le carbone organique dissout. La couche vadose se présente donc comme un filtre efficace contre le transfert des bactéries de la surface vers l'aquifère mais elle induit une sélection des espèces déjà présentes dans la nappe phréatique.

En 2013, des travaux réalisés à partir des sédiments du bassin d'infiltration Django-Reinhardt avaient permis l'isolement pour la première fois en Europe de plusieurs souches du genre *Nocardia* dans un environnement urbain, dont un isolat de l'espèce pathogène *N. cyriacigeorgica* (Stage Christophe Martin, 2013). Les travaux de thèse de Jérémy Voisin (2017) ayant démontré la présence de bactéries dans l'eau de la nappe phréatique malgré le rôle de filtre que jouent la zone vadose, une recherche de *Nocardia* a été effectuée dans ces échantillons. La présence de *Nocardia* a été révélée dans ces échantillons par une PCR spécifique à ce genre bactérien (Stage M2 Eva Gutbraut, 2015). Ces résultats invitent à se questionner sur la présence éventuelle de chemins préférentiels pour l'infiltration des bactéries, ou une capacité de survie de celles-ci dans des environnements pourtant pauvres en carbone organique et en oxygène.

### 3. Une Actinobactérie pathogène opportuniste d'origine environnementale : *Nocardia*

#### 3.1. Généralités sur le genre *Nocardia*

C'est Edmond Nocard (1850-1903), un vétérinaire français, qui a isolé en 1888 la première souche de *Nocardia* dans un troupeau de bœufs atteint du farcin en Guadeloupe et la nomme *Streptothrix farcinica* (Nocard, 1888). L'année suivante, Vittore Benedetto Antonio Trévisan de Saint-Léon (1818-1897) crée un nouveau genre bactérien et l'appelle *Nocardia* en l'honneur d'Edmond Nocard. La souche originale a donc été renommée *Nocardia farcinica*. Hans Eppinger (1879-1946), isole la première souche de ce genre bactérien sur un patient décédé d'une pneumopathie en 1896 et la nomme *Cladothrix asteroides* (Eppinger 1896). C'est Raphaël Blanchard (1857-1919) qui la rattachera au genre *Nocardia* en 1896 pour donner le nom *Nocardia asteroides*, qui deviendra de nombreuses années plus tard la souche type du genre *Nocardia* (Skerman, 1980).

Depuis, de nombreuses autres espèces pathogènes ont été décrites dans des cas d'infections humaines telles que *N. abscessus* (Yassin *et al.*, 2000), *N. cyriacigeorgica* (Yassin *et al.*, 2001) ou *N. nova* (Tsukamura, 1983) entre autres. En plus de leur implication bien connue chez l'homme, on retrouve aussi plusieurs espèces pathogènes telles que *N. farcinica* ou *N. otitidiscaviarum* infectant les bovidés (chamois, gazelles et vaches) (Bawa *et al.*, 2010 ; Domenis *et al.*, 2009 ; Kinde *et al.*, 1992), *N. veterana* ou *N. cyriacigeorgica* chez les canidés



(chiens et renards) (Uhde *et al.*, 2016), *N. asteroides* chez les cervidés (antilopes, cerfs et rennes) (Sato & Mochizuki, 1986 ; Vemireddi *et al.*, 2007), les cétacés (baleines, bélugas, dauphins et marsouins) (Jasmin *et al.*, 1972 ; Lair *et al.*, 2016 ; Martineau *et al.*, 1988), les crustacés (écrevisses) (Alderman & Feist, 1986), *N. brasiliensis* chez les équidés (chevaux) (Deem & Harrington, 1980), *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica* et *N. nova* chez les félinés (chats) (de Farias *et al.*, 2012), les oiseaux (canards, passereaux, perroquets, pigeons...) (Darzi *et al.*, 2006 ; Iyer & Rao, 1971 ; Long *et al.*, 1983 ; Parnell *et al.*, 1983), *N. farcinica* chez les ovidés (chèvres et moutons) (Maldonado *et al.*, 2004), *N. seriolae* et *N. salmonicida* chez les poissons (anguilles, hippocampes, saumons, truites...) (Brosnahan *et al.*, 2017 ; Dill *et al.*, 2017 ; Ghittino & Penna, 1968 ; Kim *et al.*, 2018), les primates (babouins, macaques et orang-outangs) (Liebenberg & Giddens, 1985 ; McClure *et al.*, 1976 ; Sakakibara *et al.*, 1984), *N. crassostreae* chez les mollusques (huîtres et moules) (Friedman *et al.*, 1998 ; Carella *et al.*, 2013 ; Engelsma *et al.*, 2008) et les suidés (porcs et sangliers) (Koehne & Giles, 1981 ; Matos *et al.*, 2015). De rares cas de nocardioses ont été rapportés chez les plantes impliquant *N. vaccinii* (Locci, 1994) ou *N. endophytica* chez *Jatropha curcas* (Xing *et al.*, 2011).

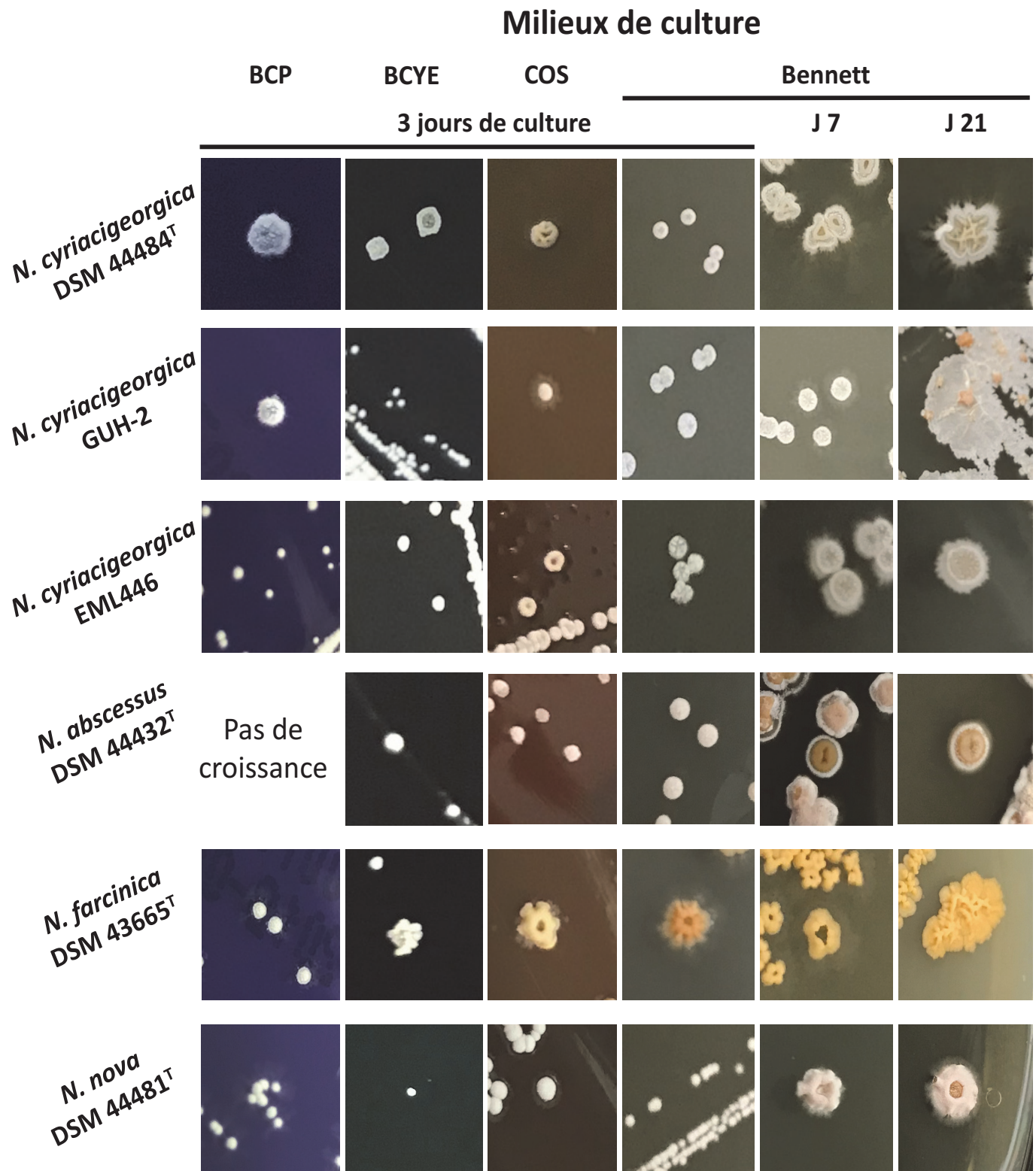
De nombreuses autres espèces ont également été décrites dans des environnements très variés comme par exemple *N. acidivorans*, *N. soli* ou *N. yunnanensis* qui ont été retrouvées dans le sol (Kämpfer *et al.*, 2007 ; Maldonado *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2019), *N. callitridis* ou *N. artemisiae* dans la rhizosphère (Kaewkla *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2011), *N. xestospongiae* dans une éponge marine (*Xestospongia* sp.) (Thawai *et al.*, 2017), *N. aurea*, *N. altamirensis*, *N. cavernae*, *N. jejuensis* ou *N. speluncae* dans des grottes (Fang *et al.*, 2018 ; Jurado *et al.*, 2008 ; Lee, 2006 ; Li *et al.*, 2017 ; Seo *et al.*, 2007). A ce jour, aucune de ces espèces n'a été rapportée en pathologie humaine.

Les *Nocardia* sont des Actinobactéries à Gram positif, aérobies strictes et non mobiles. Elles présentent généralement des hyphes aériens à l'exception de certaines espèces comme *N. aobensis*, *N. crassostreae*, *N. kroppenstedtii* et *N. mexicana* (Fatahi-Bafghi, 2018). Ce sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement qui vivent à l'état saprophyte dans le sol où elles participent à la décomposition de la matière organique.

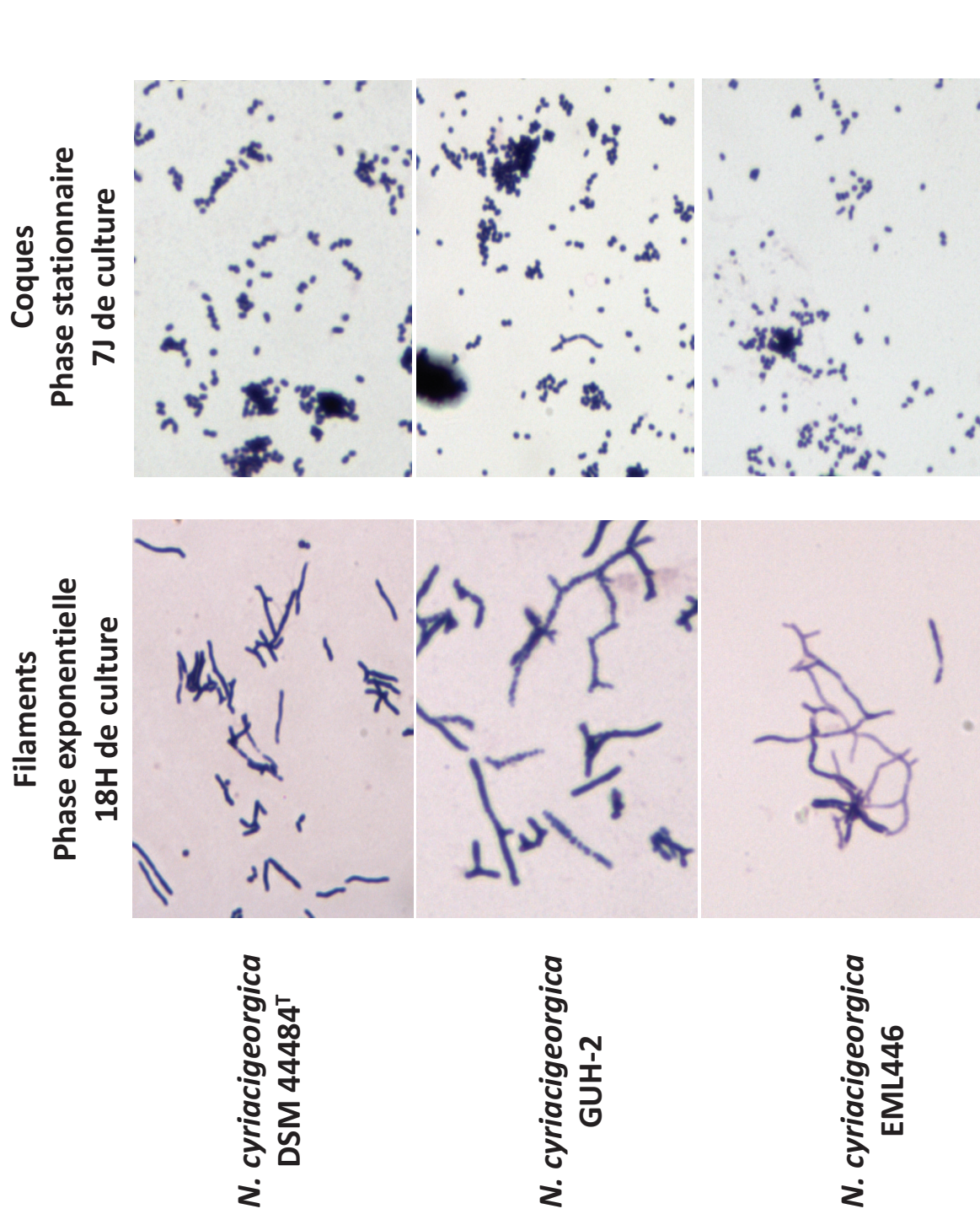
Sur un milieu de culture gélosé, l'aspect macroscopique des colonies de *Nocardia* varie beaucoup en fonction de l'espèce et même de la souche, en fonction de l'âge de la culture et du milieu utilisé (**Figure 3.1**). Les colonies sont légèrement surélevées en dôme, leur surface est souvent plissée, et se recouvre après plusieurs jours de courts filaments aériens blanchâtres masquant la couleur de la colonie et lui donnant un aspect crayeux ou poudreux (Rodriguez-Nava *et al.*, 2019). Certaines colonies apparaissent pigmentées : leur couleur peut varier du beige-jaune, voire au blanc, à l'orange ou au rouge-rose. Leur consistance est bien souvent ferme mais friable et la plupart d'entre elles sont incrustées dans la gélose. L'aspect des colonies ainsi que la coloration constituent les premières étapes d'identification de ces bactéries. La croissance des colonies est habituellement de deux à trois jours mais plusieurs

souches requièrent des temps d'incubation plus longs allant jusqu'à 15 jours (Pujic *et al.*, 2015).

L'aspect microscopique est également très variable car plusieurs formes sont observées, ce qui rend difficile la reconnaissance de la bactérie sur ce seul aspect morphologique. En effet, en phase exponentielle de croissance, la bactérie se présente sous forme filamenteuse avec un aspect « tigré » lors d'une coloration de Gram, alors qu'en phase stationnaire, les filaments se fragmentent pour donner des coques et des bacilles (**Figure 3.2**).



**Figure 3.1.** Aspects macroscopiques de cultures de *Nocardia cyriacigeorgica* DSM44484<sup>T</sup>, GUH-2, EML446, *N. abscessus* DSM44432<sup>T</sup>, *N. farcinica* DSM43665<sup>T</sup>, *N. nova* DSM44481<sup>T</sup> sur milieux de cultures BCP (bromocrésol pourpre), BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract), COS (Gélose Columbia au sang) et Bennett et différents temps de culture (3, 7 et 21 jours)



**Figure 3.2.** Aspects microscopiques de *Nocardia cyriacigeorgica* DSM44484<sup>T</sup>, GUH-2, EML446 après une coloration de Gram après 18h (phase filamenteuse) et 7 jours (phase cocciode) de croissance sur milieu Bennett



### 3.2. Taxonomie et génétique du genre *Nocardia*

Comme pour toutes les espèces bactériennes dont l'intérêt épidémiologique, écologique ou industriel est important, la connaissance du genre *Nocardia* a connu un vrai essor depuis le début des années 2000 notamment avec le développement d'outils moléculaires puissants. En effet, avant l'année 2000, seulement 16 espèces de *Nocardia* avaient été décrites (Conville *et al.*, 2000). C'est grâce au séquençage du gène *rrs* et à l'utilisation des outils bio-informatiques que la taxonomie du genre *Nocardia* a vu augmenter de manière significative le nombre de nouvelles espèces et de complexes d'espèces là où les caractères phénotypiques n'étaient pas suffisamment résolutifs (Yassin *et al.*, 2000 ; 2001 ; Kageyama *et al.*, 2004 ; 2005).

En 2007, le genre *Nocardia* contient 50 espèces officiellement reconnues (*i.e.* dont leur nom a été publié en suivant les règles officielles de description d'une nouvelle espèce) dont une trentaine impliquées en pathologie humaine (Schlaberg *et al.*, 2008). Cependant, la description de nouvelles espèces n'a cessé d'augmenter depuis ces dernières années rendant la taxonomie du genre *Nocardia* de plus en plus complexe. Plusieurs sites assignés à la mise à jour de la taxonomie bactérienne existent, par exemple, le site bacterio.net (<http://www.bacterio.net/nocardia.html>, Euzéby, 1997) comporte un grand nombre d'espèces décrites du genre *Nocardia* mais malheureusement ce site n'est pas toujours actualisé. En effet, les espèces décrites récemment ne figurent pas encore dans cette liste, à savoir : *N. aciditolerans*, *N. aurea*, *N. boironii*, *N. donostiensis* et *N. zhihengii*...

D'autres sites tels que le NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>) proposent également une liste pour l'ensemble des espèces décrites. Malheureusement, on trouve des espèces dont la description n'a jamais été officiellement reconnue. C'est le cas de *N. alboflava*, *N. argentinensis*, *N. canicruria*, *N. caverna*, *N. devorans*, *N. fusca*, *N. interforma*, *N. levis*, *N. lillensis*, *N. novocastrensa*, *N. pseudosporangifera*, *N. roseoalba*, *N. salmonicolor*, *N. strombolensis*, *N. sylvodorifera*, *N. tartaricans* et *N. violaceofusca*.

Ce qu'il faut retenir aujourd'hui en termes de classification, c'est que le genre *Nocardia* appartient au règne des « *Bacteria* », à l'embranchement des « *Actinobacteria* » et à la classe des « *Actinobacteria* ». En ce qui concerne l'ordre, les *Nocardia* ont pendant longtemps été rattachées aux « *Actinomycetales* » (Lechevalier & Lechevalier, 1967). En 2012, Goodfellow *et al.*, proposent le terme de « *Corynebacteriales* » qui sera officiellement accepté trois ans plus tard (Oren & Garrity, 2015). En 2019, Gupta fit remarquer que cet ordre comprend également celui des « *Mycobacteriales* » (Gupta, 2019). Or, selon les règles 23a et 24a du code international de la nomenclature des procaryotes (Parker *et al.*, 2019), le principe d'antériorité veut que ce soit le nom proposé en premier qui soit conservé, à savoir ici le terme « *Mycobacteriales* ». Le terme actuellement en vigueur de « *Corynebacteriales* » est donc susceptible d'être modifié dans les années à venir. Si on fait un recensement des espèces

officiellement référencées sur les différentes bases de données, on arrive à un total de 114 espèces de *Nocardia* en Octobre 2019. En tout, ce sont 60 espèces qui ont été décrites dans des infections humaines et 54 jusqu'à présent non connues pour être pathogènes pour l'homme (**Tableau 3.1**).

**Tableau 3.1** : Ensemble des espèces de *Nocardia* décrites et officiellement reconnues. Les espèces surlignées en bleu ont été décrites dans des cas de nocardiose humaine.

Nom	Code DSM <sup>T</sup>	Auteurs	Pays	Origine
Souche type				
<i>N. abscessus</i>	44432	Yassin <i>et al.</i> , 2000	Allemagne	Patient
<i>N. aciditolerans</i>	45801	Golinska <i>et al.</i> , 2013	Angleterre	Sol
<i>N. acidivorans</i>	45049	Kämpfer <i>et al.</i> , 2007	Italie	Sol
<i>N. africana</i>	44991	Hamid <i>et al.</i> , 2000	Soudan	Poumons
<i>N. alba</i>	44684	Li <i>et al.</i> , 2004	Chine	Sol
<i>N. altamirensis</i>	44997	Jurado <i>et al.</i> , 2008	Espagne	Grotte
<i>N. amamiensis</i>	45066	Yamamura <i>et al.</i> , 2007	Japon	Sol champ
<i>N. amikacinotolerans</i>	45539	Ezeoke <i>et al.</i> , 2013	USA	Patient
<i>N. anaemiae</i>	44821	Kageyama <i>et al.</i> , 2005	Japon	Patient
<i>N. aobensis</i>	44805	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. araoensis</i>	44729	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. arizonensis</i>	45748	Lasker <i>et al.</i> , 2015	USA	Pulmonaire
<i>N. artemisiae</i>	45379	Zhao <i>et al.</i> , 2011	Chine	Rhizosphère
<i>N. arthritidis</i>	44731	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Articulaire
<i>N. asiatica</i>	44668	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. asteroides</i>	43757	Trévisan, 1890	-	Patient
<i>N. aurea</i>	103986	Fang <i>et al.</i> , 2018	Chine	Grotte
<i>N. beijingensis</i>	44636	Wang <i>et al.</i> , 2001	Chine	Eaux usées
<i>N. bhagyanensis</i>	103495	Vaddavalli <i>et al.</i> , 2014	Inde	Rhizosphère
<i>N. blacklockiae</i>	45135	Conville <i>et al.</i> , 2008	USA	Pulmonaire
<i>N. boironii</i>	101696	Gilquin <i>et al.</i> , 2016	France	Cutané
<i>N. brasiliensis</i>	43758	Pinoy, 1913	-	-
<i>N. brevicatena</i>	43024	Lechevalier <i>et al.</i> , 1961	-	-
<i>N. caishijiensis</i>	44831	Zhang <i>et al.</i> , 2003	Chine	Sol
<i>N. callitridis</i>	45353	Kaewkla & Franco, 2010	Australie	Rhizosphère
<i>N. camponoti</i>	100526	Liu <i>et al.</i> , 2016	Japon	Fourmis
<i>N. carnea</i>	43397	Castellani & Chalmers, 1913	-	-
<i>N. casuarinae</i>	45978	Ghodhbane-Gtari <i>et al.</i> , 2014	Tunisie	Rhizosphère
<i>N. cavernae</i>		Li <i>et al.</i> , 2017	Chine	Grotte
<i>N. cerradoensis</i>	44546	Albuquerque de Barros <i>et al.</i> , 2003	Brésil	Sol
<i>N. coeliaca</i>	44595	Waksman & Henrici, 1948	-	Sol

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

<i>N. concava</i>	44804	Kageyama <i>et al.</i> , 2005	Japon	Patient
<i>N. coubleae</i>	44960	Rodriguez-Nava <i>et al.</i> , 2007	Koweït	Sol
<i>N. crassostreae</i>	44597	Friedman <i>et al.</i> , 1998	Canada	Huître
<i>N. cummidelens</i>	44490	Maldonado <i>et al.</i> , 2000	Angleterre	Caoutchouc
<i>N. cyriacigeorgica</i>	44484	Yassin <i>et al.</i> , 2001	Allemagne	Pulmonaire
<i>N. donostiensis</i>	46814	Ercibengoa <i>et al.</i> , 2016	Espagne	Pulmonaire
<i>N. elegans</i>	44890	Yassin <i>et al.</i> , 2005	Allemagne	Crachat
<i>N. endophytica</i>	45666	Xing <i>et al.</i> , 2011	Chine	Plante
<i>N. exalbida</i>	44883	Lida <i>et al.</i> , 2006	Japon	Patient
<i>N. farcinica</i>	43665	Trevisan, 1889	Réunion	Bœuf
<i>N. flavorosea</i>	44480	Chun <i>et al.</i> , 1998	Corée	Sol
<i>N. fluminea</i>	44489	Maldonado <i>et al.</i> , 2000	Angleterre	Rivière
<i>N. gamkensis</i>	44956	Le Roes & Meyers, 2006	Afrique du Sud	Sol
<i>N. globerula</i>	44596	Waksman & Henriici, 1948	-	Sol
<i>N. goodfellowii</i>	45516	Sazak <i>et al.</i> , 2012	Turquie	Sol
<i>N. grenadensis</i>	45869	Kämpfer <i>et al.</i> , 2012	Mer des Caraïbes	Sol
<i>N. halotolerans</i>		Moshtaghi Nikou <i>et al.</i> , 2015	Iran	Sol salin
<i>N. harenae</i>	45095	Seo & Lee, 2006	Corée du Sud	Sol plage
<i>N. heshunensis</i>	46764	Huang <i>et al.</i> , 2017	Chine	sol
<i>N. higoensis</i>	44732	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. ignorata</i>	44496	Yassin <i>et al.</i> , 2001	Europe/Koweït	Sol/Pulmonaire
<i>N. inohanensis</i>	44667	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. iowensis</i>	45197	Lamm <i>et al.</i> , 2009	USA	Sol
<i>N. jejuensis</i>	44959	Lee, 2006	Corée du Sud	Grotte
<i>N. jiangsuensis</i>	101725	Bai <i>et al.</i> , 2016	Chine	Côte mer
<i>N. jiangxiensis</i>	17684	Cui <i>et al.</i> , 2005	Chine	Sol
<i>N. jinanensis</i>	45048	Sun <i>et al.</i> , 2009	Chine	Sol
<i>N. kroppenstedtii</i>	45810	Jones <i>et al.</i> , 2014	Angleterre	Pulmonaire
<i>N. kruczakiae</i>	44877	Conville <i>et al.</i> , 2004	USA	Pulmonaire
<i>N. lasii</i>	100525	Liu <i>et al.</i> , 2016	Chine	Fourmis
<i>N. lijiangensis</i>	44933	Xu <i>et al.</i> , 2005	Chine	Sol
<i>N. mangyaensis</i>		Yang <i>et al.</i> , 2019	Chine	Sol
<i>N. mexicana</i>	44952	Rodriguez-Nava <i>et al.</i> , 2004	Mexique	Patient
<i>N. mikamii</i>	45174	Jannat-Khah <i>et al.</i> , 2010	USA	Pulmonaire
<i>N. miyunensis</i>	17685	Cui <i>et al.</i> , 2005	Chine	Sol
<i>N. neocaledoniensis</i>	44717	Saintpierre-Bonaccio <i>et al.</i> , 2004	Nouvelle Calédonie	Sol
<i>N. niigatensis</i>	44670	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. ninae</i>	44978	Laurent <i>et al.</i> , 2007	France	Pulmonaire
<i>N. niwae</i>	45340	Moser <i>et al.</i> , 2011	USA	Pulmonaire
<i>N. nova</i>	43256	Tsukamura, 1983	Thaïlande	Sol
<i>N. otitidiscaviarum</i>	43242	Snijder, 1924	-	-

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

<i>N. panacis</i>		Hu <i>et al.</i> , 2019	Chine	Rhizosphère
<i>N. paucivorans</i>	44386	Yassin <i>et al.</i> , 2000	Allemagne	Crachat
<i>N. pigrifrangens</i>	44957	Wang <i>et al.</i> , 2004	Chine	Agarose
<i>N. pneumoniae</i>	44730	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. polyresistens</i>		Xu <i>et al.</i> , 2005	Chine	Sol
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	44290	Ruimy <i>et al.</i> , 1996	France	Patient
<i>N. pseudovaccinii</i>	43406	Kim <i>et al.</i> , 2002	Corée	Sol
<i>N. puris</i>	44599	Yassin <i>et al.</i> , 2003	Allemagne	Abcès
<i>N. rayongensis</i>		Tanasupawat <i>et al.</i> , 2016	Thaïlande	Sol forestier
<i>N. rhamnosiphila</i>	45147	Everest <i>et al.</i> , 2011	Afrique du Sud	Compost
<i>N. rhizosphaerae</i>		Wang <i>et al.</i> , 2015	Chine	Rhizosphère
<i>N. rhizosphaerihabitans</i>		Ding <i>et al.</i> , 2018	Chine	Rhizosphère
<i>N. salmonicida</i>	40472	Isik <i>et al.</i> , 1999	-	Saumon
<i>N. seriolae</i>	44129	Kudo <i>et al.</i> , 1988	Japon	Poisson
<i>N. shimofusensis</i>	44733	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Sol
<i>N. shinanonensis</i>		Matsumoto <i>et al.</i> , 2016	Japon	Patient
<i>N. sienata</i>	44766	Kagayama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. soli</i>	44488	Maldonado <i>et al.</i> , 2000	Angleterre	Sol
<i>N. speluncae</i>	45078	Seo <i>et al.</i> , 2007	Corée du Sud	Grotte
<i>N. stercoris</i>		Zhao <i>et al.</i> , 2019	Chine	Bouse de vache
<i>N. sungurluensis</i>	45714	Camas <i>et al.</i> , 2014	Turquie	Sol
<i>N. takedensis</i>	44801	Yamamura <i>et al.</i> , 2005	Japon	Sol
<i>N. tenerifensis</i>	44704	Kämpfer <i>et al.</i> , 2004	Espagne	Rhizosphère
<i>N. tengchongensis</i>		Li <i>et al.</i> , 2017	Chine	sol
<i>N. terpenica</i>	44935	Hoshino <i>et al.</i> , 2007	Japon	Pulmonaire
<i>N. testacea</i>	44765	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. thailandica</i>	44808	Kagayama <i>et al.</i> , 2005	Thaïlande	Patient
<i>N. thraciensis</i>	45517	sazak <i>et al.</i> , 2012	Turquie	Sol
<i>N. transvalensis</i>	43405	Pijper & Pullinger, 1927	Afrique du Sud	Mycétome pied
<i>N. uniformis</i>	43136	Isik <i>et al.</i> , 1999	-	Sol
<i>N. vaccinii</i>	43285	Demaree & Smith 1952	-	Plante
<i>N. vermiculata</i>	44807	Kageyama <i>et al.</i> , 2005	Japon	Patient
<i>N. veterana</i>	44445	Gürtler <i>et al.</i> , 2001	Australie	Patient
<i>N. vinacea</i>	44638	Kinoshita <i>et al.</i> , 2001	Japon	Sol
<i>N. vulneris</i>	45737	Lasker <i>et al.</i> , 2014	USA	Patient plaie
<i>N. wallacei</i>	45136	Conville <i>et al.</i> , 2008	USA	Pulmonaire
<i>N. xestospongiae</i>		Thawai <i>et al.</i> , 2017	Thaïlande	Eponge
<i>N. xishanensis</i>	44895	Zhang <i>et al.</i> , 2004	Chine	Sol
<i>N. yamanashiensis</i>	44669	Kageyama <i>et al.</i> , 2004	Japon	Patient
<i>N. yunnanensis</i>	46763	Zhang <i>et al.</i> , 2019	Chine	Sol
<i>N. zapadnayensis</i>	45872	Ozdemir-Kocak <i>et al.</i> , 2015	Turquie	Sol
<i>N. zhihengii</i>	100515	Huang <i>et al.</i> , 2018	Chine	sol



### 3.3. Ecologie de *Nocardia*

Comme la majorité des Actinobactéries, les *Nocardia* sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement, c'est-à-dire que l'on peut les retrouver dans tous les types de milieux. En effet, elles sont présentes dans les eaux aussi bien douces que salées ainsi que sur les plantes (Rodriguez-Nava *et al.*, 2019). On peut aussi les retrouver adsorbées aux particules de poussière, ce qui leur permet d'être sous forme aérosolisée et facilite ainsi la dissémination de la bactérie dans l'environnement (Bernardin-Souibgui *et al.*, 2018). Les *Nocardia* sont également cosmopolites, elles ont été décrites tout autour du globe par de nombreux auteurs.

#### 3.3.1. Respiration anaérobie facultative de *Nocardia* ?

Les *Nocardia* ainsi que les autres *Corynebacteriales* sont des microorganismes à respiration aérobies strictes, *i.e.* qu'il leur faut des conditions d'oxygénation normales (environ 20 % d'O<sub>2</sub>) pour qu'elles puissent se développer. En ce qui concerne le genre *Nocardia*, très peu d'informations sont disponibles sur sa capacité à survivre en milieu anoxique. Blackall *et al.*, (1991) ont tenté de démontrer une éventuelle respiration anaérobie sans y parvenir chez *N. amarae* dans le cadre d'une étude faite sur les boues d'épuration. Cette bactérie aurait pu être utilisée pour la dépollution et le traitement des eaux usées car elle limite le développement de bulles de matière organique à la surface des bassins d'aération des stations d'épuration. Malheureusement, quelques années plus tard, la taxonomie a montré que l'espèce étudiée à l'époque appartient en réalité au genre *Gordonia*, groupe proche phylogénétiquement des *Nocardia*. D'autres études rapportent également la présence de *N. asteroides* dans ces mêmes boues d'épuration mais elles ne font pas référence à une potentielle respiration anaérobie (Fatahi, 2016 ; Soddell & Seviour, 1990).

Grâce au génome disponible de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 séquencé par Zoropogui *et al.*, (2012 ; 2013), la présence des gènes *nirBD* et *narBGHIJKY* impliqués dans la dénitrification a été mise en évidence, *i.e.* une respiration anaérobie basée sur le cycle de l'azote. Chen *et al.*, (2017) utilisent la présence de ces gènes comme un potentiel facteur explicatif de la survie des *Nocardia* à l'intérieur des macrophages par un mécanisme de respiration microaérobie ou anaérobie. La présence de ces gènes suggère la possibilité que les *Nocardia* puissent croître dans des conditions de faible oxygénation, aussi bien chez l'hôte que dans l'environnement. Cette hypothèse a été renforcée par l'isolement de plusieurs souches de *Nocardia* dans un milieu pauvre en dioxygène comme les sédiments d'un bassin d'infiltration (stage M1 Christophe Martin, communication personnelle) ou par la présence des traces d'ADN de *Nocardia* dans les eaux de la nappe phréatique située sous ce bassin d'infiltration (Thèse Voisin, 2017). Pour l'heure, aucune étude réalisée sur ce genre ne permet de confirmer ou d'infirmer une éventuelle respiration anaérobie mais sa propriété « aérobie stricte » peut être remise en question.

### 3.3.2. *Nocardia* et son métabolisme dans les environnements pollués

Les *Nocardia*, comme d'autres Actinobactéries telles que *Mycobacterium*, *Rhodococcus* ou *Gordonia* entre autres (Kim *et al.*, 2010 ; 2002 ; Xue, 2003), sont connues pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures, notamment divers hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des alcanes (Luo *et al.*, 2014b ; Quatrini *et al.*, 2008).

Plusieurs espèces environnementales ont été isolées à partir de sables bitumineux (Aghamirian & Ghiasian, 2009 ; Khan *et al.*, 2000 ; Luo *et al.*, 2014a ; Quatrini *et al.*, 2008) grâce à leurs propriétés hydrophobes et leur capacité à dégrader certains composés hydrocarbonés (Nhi-Cong *et al.*, 2010). De plus, de forts taux de *Nocardia* appartenant à des espèces pathogènes ont été retrouvés dans des environnements pollués tels que des sols agricoles (communication personnelle) et plus récemment des environnements urbains comme des bassins de rétention (Bernardin-Souibgui *et al.*, 2018 ; Sébastien *et al.*, 2014) et d'infiltration (Vautrin *et al.*, 2019) ou encore des effluents hospitaliers (Rahdar *et al.*, 2017). Cette présence peut s'expliquer en partie par les taux de polluants significatifs comme des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des polychlorobiphényles (PCB), des huiles ou encore des pesticides (Winiarski *et al.*, 2014).

De nombreuses études sont à mener pour pouvoir répondre à ces deux grandes questions de la dégradation/assimilation des produits hydrocarbonés et azotés par les *Nocardia* et plus largement par les Actinobactéries. Malgré cela, quelques études comme celle de Zeinali *et al.*, (2008) cherchent à déterminer le métabolisme de dégradation du naphtalène par la souche *N. otitidiscaviarum* TSH 1 et il est suggéré que l'une des premières voies de dégradation est la désoxygénation. Très souvent, pour dégrader un composé hydrocarboné, les bactéries ont recours à des enzymes qui activent la réaction de dégradation, et c'est ainsi qu'un hydrocarbure est oxydé avant de pouvoir être assimilé par la bactérie (Widdel & Rabus, 2001).

Cette croissance bactérienne en milieu pollué constitue une source de stress pouvant entraîner des mutations mais aussi l'apparition de gènes de résistance à certains antibiotiques. Par exemple, Ali *et al.*, (2012) ont démontré une corrélation entre la capacité de nombreuses souches d'Actinobactéries (notamment des *Nocardia*) à dégrader des hydrocarbures et leur résistance aux métaux lourds tels que l'arsenic et le cadmium. Malheureusement, les deux espèces de *Nocardia* retrouvées (*N. corallina* et *N. paraffinea*) sont deux espèces qui n'ont jamais été officiellement reconnues. Guo *et al.*, (2019) ont quant à eux démontré l'influence de la Cyromazine (un insecticide) sur l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques. Ils concluent que les Protéobactéries et les Actinobactéries sont les deux principaux phyla comportant ces gènes de résistance aux antibiotiques. D'autre part, Lu *et al.*, (2018) ont démontré que des concentrations environnementales de Triclosan (un biocide largement répandu dans de nombreux produits d'hygiène) de 0,2 mg/L peuvent conduire à des phénomènes de MDR (Multi Drug Resistance) chez *Escherichia coli* avec

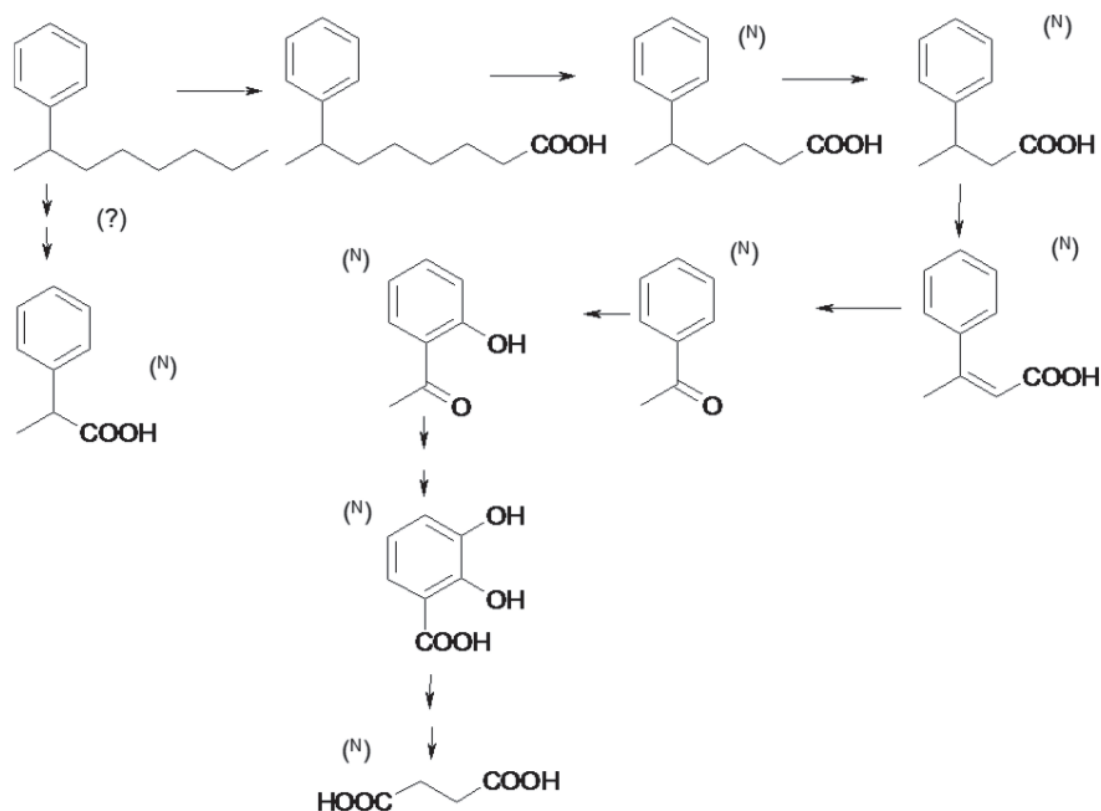
notamment la mutation de certains gènes impliqués dans la résistance de plusieurs antibiotiques tels que *fabI*, *frdD*, *marD*, *acrR* et *soxR*. La présence de ce biocide dans le milieu naturel pourrait donc entraîner des phénomènes de résistance aux antibiotiques chez *Nocardia* qui est largement répandue dans l'environnement. Des travaux menés sur des lacs urbains chinois démontrent une forte corrélation entre la présence de métaux lourds dans ces eaux et l'acquisition/co-sélection de gènes de résistance aux antibiotiques (Yang et al., 2017). Ces résultats sont confortés par la revue d'Almakki et al., (2019) qui fait un lien entre l'hydrologie urbaine et l'acquisition/dispersion de gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement. Les activités humaines (agriculture, aquaculture, pharmacie...) rejettent de grandes quantités d'antibiotiques dans les eaux usées ou de ruissellement. Couplé à la pollution aux métaux lourds en villes (toitures, automobile...), les bactéries qui se développent dans ces environnements pollués peuvent présenter de plus forts taux de gènes de résistance à de nombreux antibiotiques, notamment ceux largement utilisés en pharmacie humaine et vétérinaire telles que les B-lactamines.

### 3.3.2.1. Les hydrocarbures comme source de carbone

La littérature est relativement riche en exemples d'Actinobactéries capables de dégrader des composés hydrocarbonés et de les utiliser comme unique source de carbone. En revanche, le terme « hydrocarbure » est relativement large puisqu'il inclut une famille entière de composés chimiques ne contenant que des atomes de carbone et d'hydrogène. Malheureusement, c'est souvent sur ce point précis que la littérature demeure floue. En effet, Khan et al., (2000, 1997) ont démontré la présence de l'espèce *N. asteroides* dans des sables pollués aux hydrocarbures lors de la guerre du Golfe au Koweït. D'après eux, les hydrocarbures présents dans le sol peuvent être considérés comme la seule source de carbone permettant le développement de *N. asteroides*. Cependant, les auteurs ne donnent pas de renseignements sur la composition exacte des hydrocarbures, ils parlent simplement de « pétrole brut ». Or la composition du pétrole brut varie en fonction de la zone où il a été extrait (dominance d'hydrocarbures linéaires, à cycles saturés ou à cycles carbonés insaturés (Moldowan et al., 1985)). Enfin, la présence de la seule espèce *Nocardia asteroides* est imputée à la présence des hydrocarbures couplée aux fortes chaleurs, au détriment des espèces *N. farcinica* et *N. otitidiscaviarum* qui n'ont pas pu être isolées, probablement à cause des fortes chaleurs recensées dans la région (supérieures à 50 °C). D'autres espèces de ce genre bactérien n'ont pas pu être décrites. Ceci est sans doute dû à la faible diversité connue alors connue (seulement 16 espèces) liée aux difficultés d'identifications et des méthodes de cette époque. Aujourd'hui, la diversité décrite serait probablement bien plus importante.

Quelques études tentent tout de même d'apporter plus de précisions. C'est notamment le cas de Quatrini et al., (2008) qui ont étudié la « diversité » des Actinobactéries isolées dans un environnement pollué, capables de dégrader des n-alcanes (dans une partie de la côte Sicilienne touchée par une marée noire après le naufrage d'un pétrolier). Parmi les cinq souches isolées, une seule souche de *N. cyriacigeorgica* a été retrouvée. Par la suite, en

testant la croissance de la bactérie sur plusieurs hydrocarbures (n-alkane : n-eicosane (C<sub>20</sub>), n-octacosane (C<sub>28</sub>) et n-hexatriacontane (C<sub>36</sub>)), les auteurs ont démontré la capacité de cet isolat à dégrader des n-alcane ayant des chaines constituées de 8 à 26 atomes de carbones. Ils ont tout de même confirmé ces résultats de culture par la détection de plusieurs copies du gène *alkB* permettant la dégradation de ces composés. Les noyaux aromatiques (cyclohexane, benzène, toluène et tétrachlorométhane) ne sont en revanche pas dégradés. Deux ans plus tard, [Nhi-Cong et al., \(2010\)](#) ont travaillé sur une souche de *N. cyriacigeorgica* isolée à partir de sables pollués aux hydrocarbures, mais provenant cette fois du désert d'Arabie Saoudite. Cette souche serait aussi capable de dégrader des alcanes comme démontré précédemment par [Quatrini et al., \(2008\)](#). Ils ont également réussi à mettre en évidence par chromatographie en phase gazeuse la capacité à dégrader des benzènes, donc des noyaux aromatiques, ce qui n'avait pas été démontré dans l'étude précédente. Ces travaux leur ont permis de proposer une voie métabolique de dégradation du *sec*-octylbenzène (**Figure 3.3**).



**Figure 3.3.** Voie métabolique de dégradation du *sec*-octylbenzène par *N. cyriacigeorgica* SBUG1472. (N) représente les métabolites identifiés par chromatographie en phase gazeuse, d'après [Nhi-Cong et al., \(2010\)](#)

### 3.3.2.2. Les pesticides comme potentielle source d'azote

L'azote, tout comme le carbone, est également un élément limitant pour le métabolisme aussi bien des plantes que des microorganismes. Certains polluants, tels que les pesticides et notamment les herbicides, sont riches en azote. Si l'on s'intéresse aux sols pollués, peu d'études à ce jour donnent des renseignements précis quant à la capacité des *Nocardia* à dégrader ces composés pour les utiliser comme source d'azote dans des environnements où nous avons l'habitude de retrouver des *Nocardia*. [Alvarez et al., \(2017\)](#) ont fait une revue portant sur les Actinobactéries capables de dégrader les pesticides afin de s'en servir comme source de carbone et d'azote. Les *Nocardia* sont citées parmi les bactéries capables de dégrader de tels composés mais aucun détail n'est donné quant aux mécanismes de dégradation impliqués dans ces voies métaboliques.

En ce qui concerne le Glufosinate (un désherbant à base de sel d'ammonium), [Yun et al., \(2010\)](#) ont mis en évidence la présence du gène *mat* (méthionine sulfone N-acétyltransférase) chez une souche de *Nocardia* spp. qui induit une résistance à cet herbicide. Ici, le gène est parfaitement fonctionnel puisqu'il a pu être cloné sur des plans de riz et d'arabette, ce qui les a rendu résistants à l'herbicide

## 4. Un environnement particulier : l'Homme et la nocardiose

### 4.1. Généralités

La nocardiose est une maladie granulomateuse et suppurative affectant principalement des patients immunodéprimés. Cependant, 30 % des personnes atteintes ne présentent pas de facteurs de risques identifiés ([Wilson, 2012](#)). Les facteurs favorisant cette maladie sont la corticothérapie (environ un tiers des patients) mais également les transplantations (12,2 %), les hémopathies (10,4 %) ou encore les néoplasies (7 %), les dilatations des bronches (5,3 %) ou le VIH (5,3 %) ([Rodriguez-Nava et al., 2019](#)).

En ce qui concerne les facteurs de prédisposition, le sex-ratio (3 : 1) n'est pas équilibré puisque les deux tiers des patients sont des hommes. Dans le cas des actinomycetomes et d'autres atteintes cutanées, l'explication la plus répandue est le mode de vie rural avec des agriculteurs qui se déplacent pieds nus, augmentant ainsi le temps de contact entre la peau (fragilisée par des coupures) et les pathogènes du sol ([Bosamiya et al., 2011](#)). Les personnes de tous âges peuvent être atteintes même si une forte partie des patients se situe dans la seconde partie de leur vie (au-delà de 50 ans). En revanche, aucun facteur ethnique ne semble entrer en jeu ([Rodriguez-Nava et al., 2019](#)). Cependant, d'autres facteurs de prédisposition longtemps négligés doivent aujourd'hui être pris en compte. En effet, les maladies broncho-pulmonaires chroniques obstructives (BPCO), la mucoviscidose, le tabagisme ou l'alcoolisme sont aussi des facteurs favorisant les nocardioses pulmonaires ([Rodriguez-Nava et al, 2015 ; Arrache et al., 2018](#)). En effet, Les *Nocardia* se développent préférentiellement dans des

environnements humides et peuvent facilement être aérosolisées, rendant les sujets précédemment cités vulnérables de par leur fragilité pulmonaire.

Les facteurs environnementaux seraient également à l'origine de la contamination des patients. En effet, [Hossein et al., \(2017\)](#) ont analysé la diversité en *Nocardia* dans un environnement hospitalier et ont trouvé une forte diversité sur les différents supports testés (eau, sols, poussières) avec une proportion de 24% de la seule espèce pathogène *N. cyriacigeorgica*. Ils en déduisent que l'environnement hospitalier est un réservoir potentiel de *Nocardia*. D'autres environnements peuvent être vus comme de potentiels réservoirs, notamment les environnements pollués. En effet, [Wang et al., \(2020\)](#) ont démontré une augmentation de l'abondance de *Nocardia* et *Rhodococcus* dans des environnements pollués aux HAP et amendés en palmitate de sodium. Les auteurs considèrent ces deux genres comme des biomarqueurs d'une pollution aux hydrocarbures. Enfin, [Ramalingam & Cupples \(2020\)](#) ont démontré la capacité de dégradation du 1,4-dioxane, un puissant insecticide rémanant maintenant interdit, par les *Nocardia* et *Mycobacterium*. Ce pesticide ayant fortement contaminé les nappes phréatiques, on peut retrouver des pathogènes qui lui sont associés dans les réserves d'eau potable, représentant un potentiel risque pour la santé humaine. En revanche, aucune étude n'a pour l'heure permis de mettre réellement en évidence un lien de cause à effet présentant clairement les voies de contaminations des patients depuis les bactéries présentes dans l'environnement.

### 4.2. Épidémiologie

La nocardiose étant une maladie rare, les données épidémiologiques sont faibles et généralement incomplètes. Par exemple, pendant longtemps, l'espèce *N. asteroides* a été considérée comme étant le facteur étiologique responsable de la majorité des cas de nocardiose. Aujourd'hui, on sait que le nombre d'agents pathogènes s'élève à 60 espèces du genre *Nocardia* décrites dans des infections humaines (**Tableau 2.1**). L'épidémiologie de cette maladie n'est pas uniforme à l'échelle mondiale car une certaine variabilité est observée entre pays et régions du monde aussi bien en terme de prévalence de la maladie, qu'en terme de répartition des espèces impliquées dans la nocardiose. Cette faible incidence de la maladie est en partie due à une méconnaissance de la maladie de la part de certains médecins. Cependant, en se basant sur la fréquence des infections pulmonaires dues à *Nocardia*, [Pujic et al., \(2015\)](#) estiment à un million le nombre de cas chaque année dans le monde.

Malgré des chiffres incertains, on estime que les cas de nocardioses ont augmenté à cause d'une croissance du nombre de patients transplantés ou présentant une immunodépression chronique ou temporaire, ainsi qu'à la diminution naturelle de l'efficacité du système immunitaire associée au vieillissement de la population, mais également à un meilleur diagnostic de la maladie ([Minero et al., 2009](#) ; [Pujic et al., 2015](#)).



En France, la nocardiose demeure une maladie rare puisque ce sont entre 150 et 250 cas par an qui sont recensés par l'OFN (Observatoire Français des Nocardioses, Institut des Agents Infectieux, hôpital de la Croix-Rousse, Lyon) (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008). Malheureusement, ces chiffres sont largement sous-estimés du fait du caractère aspécifique des symptômes et de l'absence de signalisation obligatoire des cas puisqu'aucun Centre National de Référence (CNR) n'existe en France.

Une étude épidémiologique de 2018 en France réalisée par l'OFN sur la période 2010-2015 et incluant 793 souches indique que les espèces les plus impliquées dans la nocardiose sont *N. farcinica* (20,2 %), le complexe *N. abscessus* (19,9 %), *N. nova* (19,5 %) et *N. cyriacigeorgica* (12,9 %) (Lebeaux *et al.*, 2018). Des résultats à peu près comparables avaient été observés lors d'une étude réalisée sur la période 2000-2007 (Rodriguez-Nava *et al.*, 2008). Cette étude avait permis d'approximer l'incidence nationale de la maladie à 0,3 cas/100 000 habitants (Tableau 4 .1).

Il est intéressant de remarquer qu'en Espagne, pays frontalier avec la France, les abondances varient. En effet, dans l'étude de Valdezate *et al.*, (2016), ce sont les *N. cyriacigeorgica* les plus abondantes avec 25,3 % suivi de *N. nova* (15,0 %), *N. abscessus* (12,7%) et enfin *N. farcinica* (11,4 %). L'étude a été réalisée sur une période plus longue qu'en France (2005-2014) et incluait un plus grand nombre de souches (1119). Une étude épidémiologique de 2009 avait établi une incidence de la maladie de l'ordre de 0,39 cas/100 000 habitants sur la période 1995-1998 et une augmentation des cas de 0,55 sur la période 2003-2006 (Minero *et al.*, 2009).

En Italie, la dernière étude rétrospective sur la nocardiose ne présente les cas que d'un seul hôpital et inclut donc seulement 14 patients (Mazzaferri *et al.*, 2018). Les espèces *N. cyriacigeorgica* (5/14), *N. nova* (5/14) et *N. farcinica* (4/14) étaient impliquées. Aucune valeur d'incidence de la maladie n'a pu être estimée par les auteurs. Ces données n'ont pas de valeur épidémiologique à l'échelle nationale mais sont les plus récentes et les seules disponibles actuellement.

Aux Etats-Unis, la première étude épidémiologique remonte à 1976 et les auteurs estimaient l'incidence de la maladie entre 500 et 1000 cas/an. Les espèces impliquées appartenaient en grande majorité au complexe *N. asteroides* (Beaman *et al.*, 1976). Une étude plus récente de 2014 réalisée sur la période 2006-2011 et recueillant 1299 souches donne l'espèce *N. nova* comme la plus impliquée dans la nocardiose (43,6 %) suivie de *N. cyriacigeorgica* (20,3 %), *N. farcinica* (15,7 %) et *N. brasiliensis* (11,4 %) (Schlaberg *et al.*, 2014).

Au Canada, une étude rétrospective publiée en 2011 fait état de 718 cas répartis sur la période 1988-2008 (Tremblay *et al.*, 2011). La majorité des souches identifiées lors de la première tranche (1988-2003) étaient assignées à l'espèce *N. asteroides* du fait de la faible diversité connue à cette époque. Sur la deuxième partie de l'étude, ce sont essentiellement

les espèces *N. nova* (18 %), *N. farcinica* (10,6 %), *N. brasiliensis/pseudobrasiliensis* (7,1 %) et *N. otitidiscaviarum* (4,3 %) qui ont été identifiées. L'incidence de la maladie avait été évaluée entre 0,33 cas/100 000 habitants et 0,87 cas/100 000 habitants en 1997 et 2008.

En Australie, une étude de [Paige & Spelman, \(2019\)](#) réalisée sur la période 2010-2016 recensant 67 patients a trouvé *N. nova* comme étant l'espèce la plus impliquée (29 %) suivie de *N. cyriacigeorgica* (18 %) et *N. farcinica* (15 %).

Enfin, à Taïwan, une étude rétrospective sur la période 1998-2010 faisant état de 100 cas de nocardiose, indique que *N. brasiliensis* est responsable de la moitié des cas (50 %) tandis que *N. cyriacigeorgica* n'est impliquée que dans 18 % des cas ([Liu et al., 2011](#)). Ici, la majorité des nocardioses (55 %) sont des formes cutanées de la maladie.



Tableau 4.1. Données épidémiologiques mondiales de la nocardiose

	PERIODE	NOMBRE DE SOUCHES	ABONDANCE				METHODE IDENTIFICATION	REFERENCES
			1er	2ème	3ème	4ème		
FRANCE	2010- 2015	793	<i>N. farcinica</i> 20,2%	<i>N. abscessus</i> 19,9%	<i>N. nova</i> 19,5%	<i>N. cyriacigeorgica</i> 12,9%	16S Noc1/Noc2 et <i>hsp65</i> si besoin	Lebeaux <i>et al.</i> , 2018
ESPAGNE	2005- 2014	1119	<i>N. cyriacigeorgica</i> 25,3	<i>N. nova</i> 15,0%	<i>N. abscessus</i> 12,7%	<i>N. farcinica</i> 11,4%	16S entier et <i>SecA1</i> , <i>hsp65</i> et <i>gyrB</i> si besoin	Valdezate <i>et al.</i> , 2016
ITALIE	2011- 2015	14	<i>N. cyriacigeorgica</i> 36%	<i>N. nova</i> 36%	<i>N. farcinica</i> 29%	-	16S entier	Mazzaferri <i>et al.</i> , 2018
USA	2006- 2011	1299	<i>N. nova</i> 43,6%	<i>N. cyriacigeorgica</i> 20,3%	<i>N. farcinica</i> 15,7%	<i>N. brasiliensis</i> 11,4%	16S entier	Schlager <i>et al.</i> , 2014
CANADA	2004- 2008	325	<i>N. nova</i> 18,0%	<i>N. farcinica</i> 10,6%	<i>N. brasiliensis/</i> <i>pseudobrasiliensis</i> 7,1%	<i>N. otitidiscaviarum</i> 4,3%	16S entier	Tremblay <i>et al.</i> , 2011
AUSTRALIE	2010- 2016	67	<i>N. nova</i> 29%	<i>N. cyriacigeorgica</i> 18%	<i>N. farcinica</i> 15%	-	NC	Paige & Spelman, 2019
TAÏWAN	1998- 2010	100	<i>N. brasiliensis</i> 50%	<i>N. cyriacigeorgica</i> 18%	-	-	16S Noc1/Noc2	Liu <i>et al.</i> , 2011
ALLEMAGNE	2005- 2011	37	<i>N. farcinica</i> 21,6%	<i>N. asteroides</i> 18,9%	<i>N. cyriacigeorgica</i> 8,1%	-	16S	Ott <i>et al.</i> , 2019

En revanche, ces études épidémiologiques ne font jamais état de transmission nosocomiale. De rares cas ont été reportés dans des articles leur étant consacrés du fait de leur caractère sporadique. Pour certains, il s'agissait d'épidémie liée à *N. farcinica* dans des services contenant des patients immunodéprimés tels que des services de transplantation cardiaque ou pulmonaire (Exmelin *et al.*, 1996). Dans d'autres cas, il s'agissait de patients ayant été contaminés lors de leur hospitalisation, notamment après une chirurgie prothétique ostéoarticulaire par *N. asteroides* (Mrozek *et al.*, 2008) ou par *N. farcinica* après la pose d'un cathéter (Vuotto *et al.*, 2011). La nocardiose peut également être transmise de l'animal à l'homme. Astudillo *et al.*, (2001) ont rapporté plusieurs cas de nocardiose transmise à l'homme par des griffures de chats. En revanche, aucun cas de transmission interhumaine n'est documenté (Ambrosioni *et al.*, 2010).

### 4.3. Formes cliniques

La nocardiose se présente sous cinq formes cliniques : (i) pulmonaire, (ii) cérébrale, (iii) cutanée/sous cutanée/lymphocutanée, (iv) extra-pulmonaire (autre que cérébrale et cutanée) et (v) disséminée (*i.e.* qui touche au moins deux organes). En cas de dissémination, les principaux organes touchés sont le cerveau (environ 30 %) suivi de la peau et du tissu sous-cutané (15 à 31 %) mais les autres organes ne sont pas pour autant épargnés.

La forme pulmonaire est l'atteinte majoritaire puisqu'elle est retrouvée dans 60 à 80% des cas (Filice, 2005). Elle se présente généralement sous forme d'une pneumonie nécrosante subaiguë ou chronique aux symptômes généralement polymorphes et aspécifiques (toux, expectorations, douleur pleurale, asthénie), rendant le diagnostic difficile. Ces symptômes, associés à des signes généraux (fièvre, perte de poids, sueurs nocturnes) peuvent faire penser à d'autres pathologies (Minero *et al.*, 2009). Dans ce cas de figure, le clinicien peut en effet suspecter d'autres agents étiologiques comme par exemple des mycobactéries, un genre bactérien proche de celui des *Nocardia* (*e.g.* *Mycobacterium tuberculosis* ou mycobactéries atypiques), des champignons filamenteux (*Aspergillus fumigatus*), des levures (*Cryptococcus neoformans*) ou des champignons dimorphiques (*Histoplasma capsulatum*) (Brown-Elliott *et al.*, 2006 ; Clarck, 2009 ; Lebeaux *et al.*, 2010 ; Wilson, 2012). L'examen radiographique n'est généralement pas suffisamment spécifique pour permettre de poser le bon diagnostic (Rodriguez-Nava *et al.*, 2019). En cas de nocardiose pulmonaire, un bilan neurologique est généralement demandé par le praticien car la nocardiose peut disséminer vers d'autres organes (essentiellement vers le système nerveux central) dans 45 % des cas (Figure 3.1).

La nocardiose du système nerveux central survient dans environ 1/3 des cas, le plus souvent après une dissémination à partir d'un foyer pulmonaire. Aux Etats-Unis, on estime que 1 à 2 % des abcès cérébraux sont en réalité des nocardioses cérébrales (Hooper *et al.*, 1982). Les signes cliniques sont très variés car ils dépendent notamment de la zone du cerveau atteinte. Le patient peut donc être atteint de céphalées, de nausées et vomissements, de signes de méningées, d'un déficit sensitif et/ou moteur ou encore de troubles du

comportement ([Bross & Gordon, 1991](#)). Quelle que soit la zone touchée, le pronostic est généralement assez sombre puisque la mortalité de cette forme de nocardiose est de l'ordre de 40 %.

Enfin, les formes cutanées sont une atteinte particulière puisqu'elles touchent généralement des patients immunocompétents. Elles sont divisées en 4 sous-groupes : abcès et cellulite, lymphangite, mycétome et atteinte cutanée secondaire à une dissémination ([Georghiou & Blacklock, 1992](#)). Les lésions sont généralement situées sur des parties découvertes du corps (pieds, jambes, mains). Les patients se contaminent par contact direct et répété avec les bactéries présentes dans l'environnement, généralement par la marche à pieds sans chaussure ou les travaux agricoles à mains nues. L'espèce la plus largement impliquée dans les nocardioses cutanées est *N. brasiliensis* avec une prévalence proche de 80% ([Salinas-Carmona, 2000](#)).

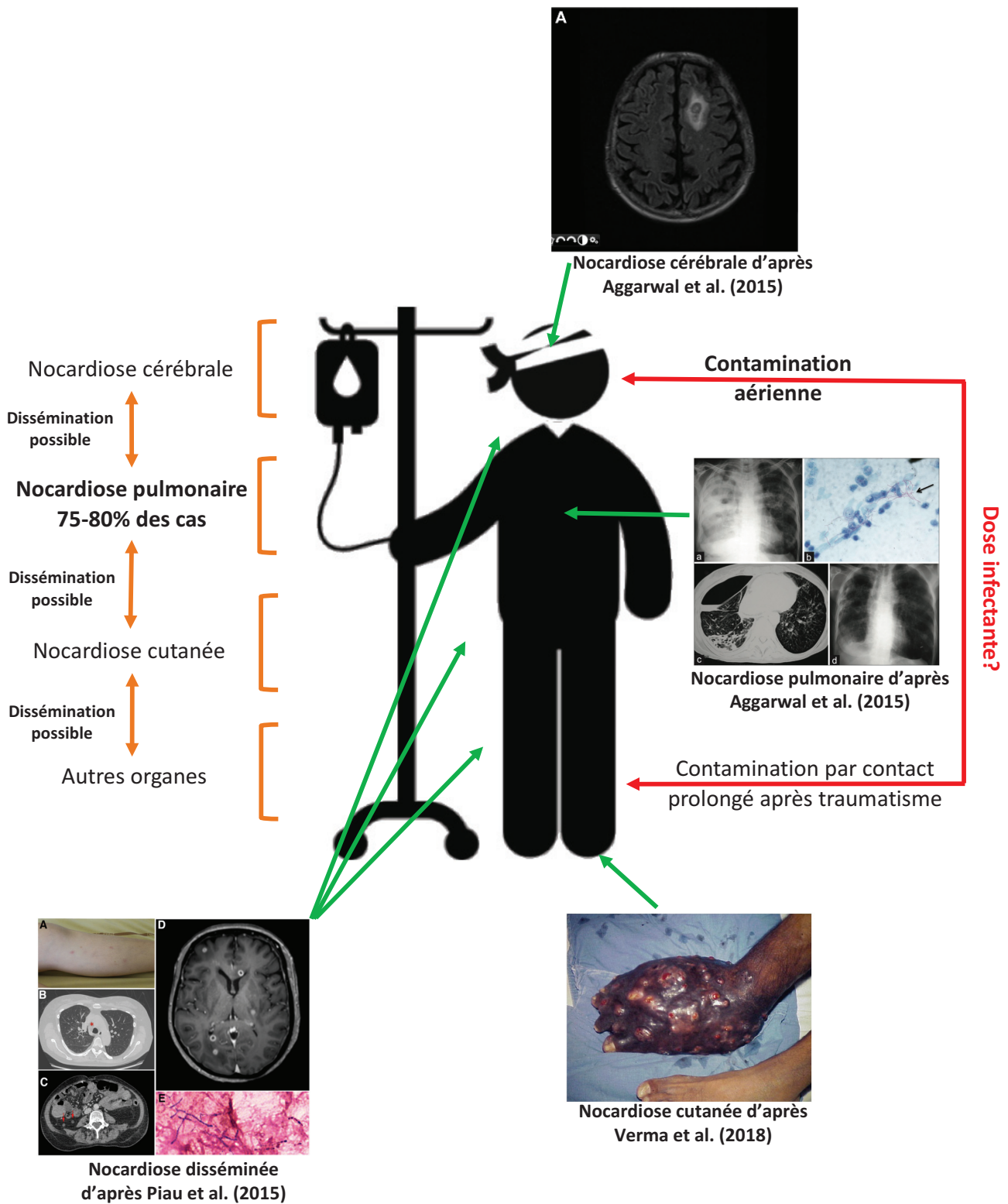


Figure 4.1. Les différentes formes de la nocardiose.

#### 4.4. Diagnostic clinique

La nocardiose étant une maladie rare, son diagnostic est difficile à poser (Conville *et al.*, 2010). En effet, sa faible incidence couplée à des symptômes aspécifiques et polymorphes n'aident pas le clinicien à soupçonner cette maladie car aucun élément clinique n'est suffisamment spécifique pour affirmer ou infirmer un diagnostic de nocardiose. De ce fait, la suspicion clinique d'une nocardiose impose une exploration microbiologique (Huang *et al.*, 2019). En fonction de l'organe touché, plusieurs prélèvements sont possibles. Cependant les prélèvements respiratoires tels qu'un lavage broncho-alvéolaire, une expectoration ou une aspiration bronchique sont les plus répandus, ce qui est dû à la forte fréquence de l'atteinte pulmonaire. Néanmoins, d'autres prélèvements du site anatomique touché peuvent également être effectués et permettre un diagnostic positif (biopsie lors d'une atteinte d'un organe profond ou dans le cas d'une atteinte cutanée). Une fois le prélèvement effectué, différents tests doivent être réalisés afin d'identifier l'espèce impliquée et de proposer un traitement adapté. La **figure 4.2** résume les différentes étapes de la démarche de diagnostic clinique.

##### 4.4.1. Examen direct

L'examen direct se fait le plus souvent par une coloration de Gram, mais la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée à froid est également possible. Elle est pratiquée immédiatement après avoir réalisé le prélèvement et permet l'orientation du diagnostic microbiologique. La présence de fins bacilles ramifiés (qui peuvent fragmenter) et tigrés à coloration de Gram positif est un élément de suspicion microscopique d'une *Nocardia* (**Figure 3.2**). Il faut cependant savoir qu'un examen direct négatif ne signifie pas forcément l'absence de *Nocardia*. Il est donc indispensable de réaliser une démarche microbiologique complète résumée dans la **figure 4.2** afin de rendre un diagnostic fiable d'une éventuelle nocardiose.

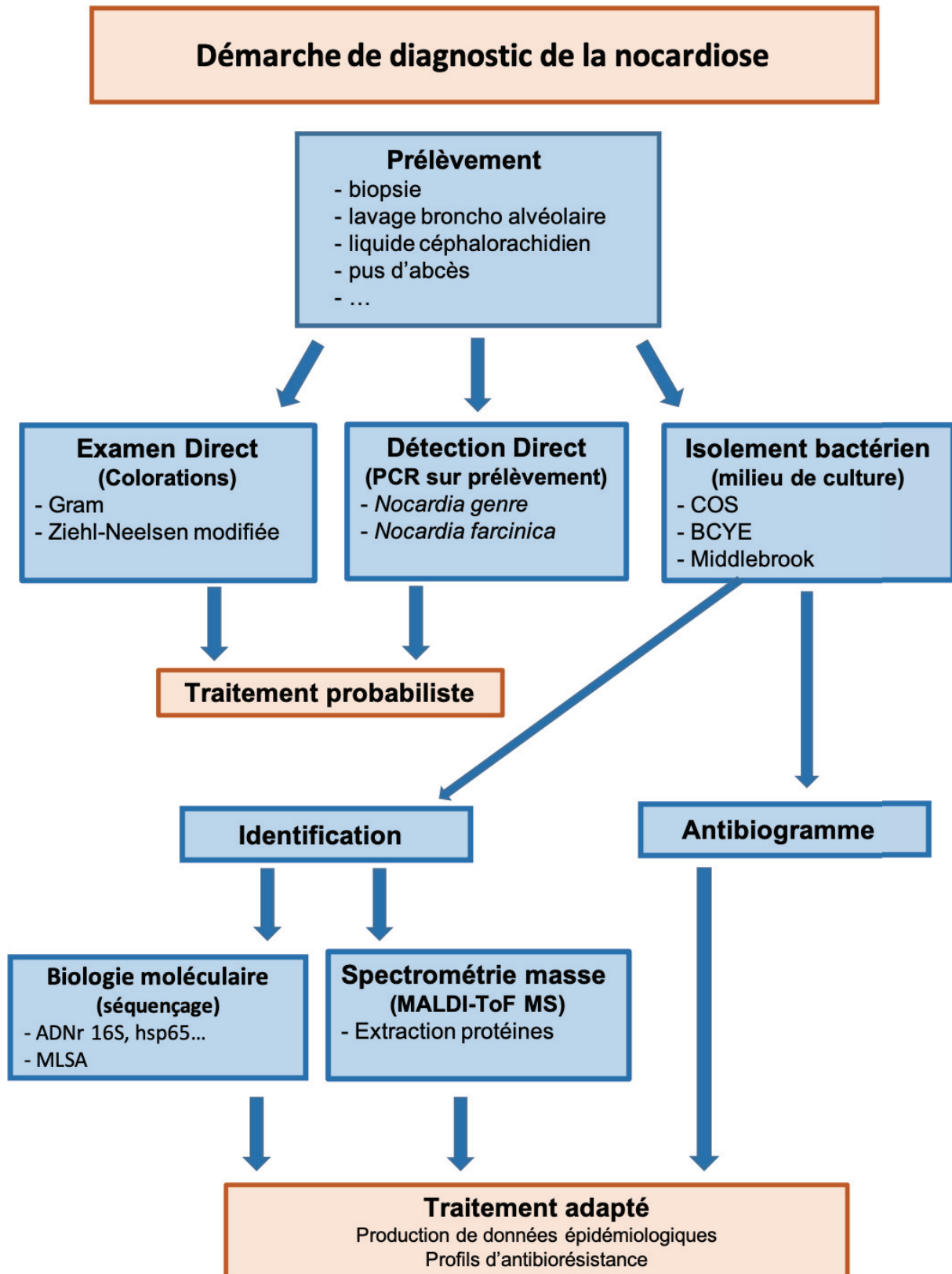


Figure 4.2. Démarche de diagnostic microbiologique d'une nocardiose

#### 4.4.2. Détection directe par biologie moléculaire

Lorsqu'une nocardiose est suspectée et qu'elle nécessite un traitement rapide au vu de l'état de santé critique d'un patient, une PCR peut être réalisée directement sur l'échantillon. Après une extraction d'ADN à partir du prélèvement, une PCR (NG) spécifique du genre *Nocardia* ciblant un fragment d'environ 600 pb du gène codant l'ARNr 16S (Laurent *et al.*, 1999), peut être réalisée. Si la PCR spécifique du genre *Nocardia* est positive, une PCR (Nf) ciblant un fragment d'environ 300 pb d'un gène dont la fonction est inconnue mais spécifique du génome de l'espèce *Nocardia farcinica* (Brown *et al.*, 2004) peut-être aussi réalisée afin de pouvoir l'identifier directement, *i.e.* sans étape de culture préalable. *N. farcinica* fait partie des espèces les plus impliquées dans les nocardioses à l'échelle mondiale et c'est même la plus fréquente en France (Lebeaux *et al.*, 2018). Ces premières détections par PCR permettent une prise en charge rapide du patient avec une antibiothérapie ciblée soit pour les *Nocardia* de façon globale, soit pour *N. farcinica* connue pour ses profils d'antibiorésistance bien définis (Galacho-Harriero *et al.*, 2017). Cependant, en l'absence d'une antibiothérapie universellement efficace pour l'ensemble des espèces de *Nocardia*, il est nécessaire de poursuivre les étapes de mise en culture afin d'isoler la souche, pour pouvoir ainsi l'identifier à l'espèce et réaliser un antibiogramme. Cette démarche d'identification proposée permettrait de produire des données épidémiologiques fiables et ainsi pouvoir proposer des traitements pour une espèce donnée (Figure 4.2).

#### 4.4.3. Profil d'antibiorésistance

Pour la réalisation d'un antibiogramme *in vitro*, plusieurs méthodes sont actuellement disponibles : la microdilution en milieu liquide (Brown-Elliott *et al.*, 2017), la diffusion de disque (Lebeaux *et al.*, 2018) ou le E-test (Valdezate *et al.*, 2017). En revanche, seule la méthode de microdilution est reconnue comme la plus efficace et reproductible entre deux laboratoires par le CLSI (Woods *et al.*, 2011). Cette méthode a l'avantage de pouvoir être automatisée et donc facile à mettre en place dans une chaîne hospitalière. Elle permet également d'obtenir les concentrations minimales inhibitrices (MIC), indispensable à l'ajustement des doses antibiotiques pour le traitement. La méthode du E-test donne aussi les MIC mais elle est plus coûteuse.

La méthode par diffusion de disques en milieu Mueller-Hinton gélosé complétement en cation n'est pas recommandée par le CLSI du fait de la grande variabilité des résultats entre laboratoires (Ambaye *et al.*, 1997). Elle a cependant été utilisée jusque récemment par l'OFN pour la réalisation des antibiogrammes car elle présente l'avantage de tester un nombre important d'antibiotiques (une trentaine) avec un minimum de matériel et pour des coûts relativement maîtrisés. Ceci présente l'avantage de proposer au praticien hospitalier une large palette d'antibiotiques pour le traitement du patient (Lebeaux *et al.*, 2018). Cette méthode est cependant difficile à automatiser et la lecture manuelle des résultats peut être très chronophage.



#### 4.4.4. Identification après isolement et mise en culture

Si une souche a pu être isolée à partir d'un prélèvement clinique, son ADN est alors extrait afin de réaliser une PCR *Noc1/Noc2* ciblant un fragment d'environ 600 pb du gène l'ARNr 16S (Rodriguez-Nava *et al.*, 2006). Les amplicons PCR sont séquencés et confrontés à une base de données, donnant ainsi une identification qui peut être fiable en fonction de l'espèce. Malheureusement, certains complexes d'espèces tels que *N. nova* ou *N. abscessus* ne peuvent être résolus à l'aide de ce seul gène (Conville *et al.*, 2010). Pour pallier à cette difficulté, d'autres gènes au pouvoir discriminant plus fort chez les *Nocardia* ont été développés tels que *gyrB*, *hsp65*, *rpoB*, *secA1* ou *sodA* (Takeda *et al.*, 2014 ; Tancsics *et al.*, 2009 ; Telenti *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 1994 ; Sanchez-Herrera *et al.*, 2017). Enfin, plusieurs auteurs tels que McTaggart *et al.*, (2010) ou Flateau *et al.*, (2013) recommandent le recours à la MLSA pour gagner en sensibilité, notamment pour la délimitation des complexes. Malheureusement, la complexité de mise en place de cette technique empêche pour le moment sa réalisation en routine dans la plupart des laboratoires d'analyse. Aujourd'hui, toute identification doit systématiquement être accompagnée d'un antibiogramme qui reste indispensable à la mise en place du traitement le plus adapté possible au patient car la sensibilité-résistance des *Nocardia* est espèce-dépendante.

#### 4.4.5. Identification nouvelle génération, le MALDI-ToF MS

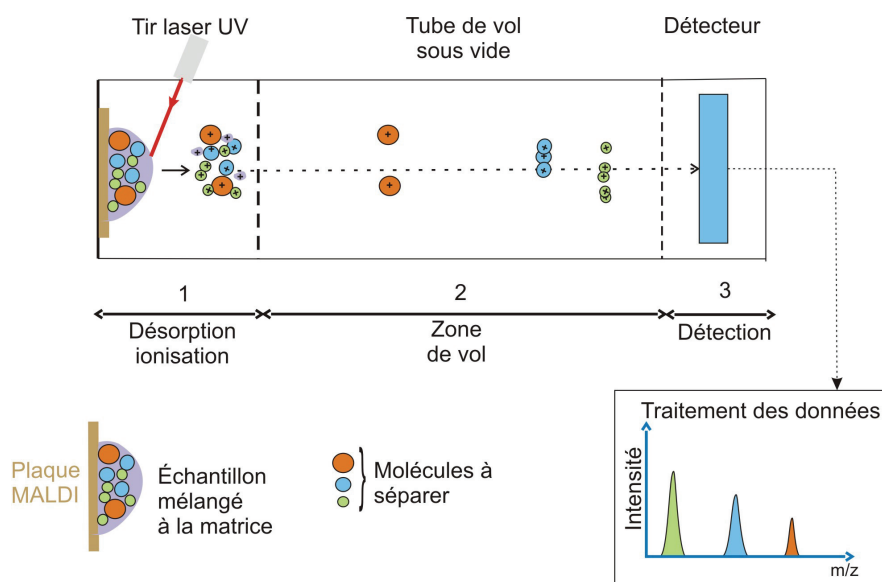
Depuis une quinzaine d'années, une nouvelle technique d'identification bactérienne est en plein essor dans les hôpitaux et permet une identification rapide et peu chère. Le MALDI-ToF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) analyse la composition protéique des bactéries par spectrométrie de masse et la compare à une base de données préétablie par le constructeur (Khot *et al.*, 2012).

Le principe d'identification, qui repose sur la spectrométrie de masse, est relativement simple. Après isolement et mise en culture d'une souche bactérienne, d'une levure ou d'un champignon, l'isolat est déposé sur une cible (généralement un support en alliage de métal) puis est recouvert d'une matrice qui permet la fixation de l'échantillon à la cible. Une fois la cible insérée dans l'appareil, un laser vient impacter l'échantillon (la matrice permet également une meilleure ionisation du dépôt) ionisant ainsi les protéines de la bactérie. Ces fragments d'un poids moléculaire de 3000 à 10 000 kDa passent dans un tube à vide avant d'arriver sur le détecteur. Plus une molécule est grosse, plus son temps de vol sera important, d'où le principe du ToF (Time of Flight, temps de vol) de l'appareil (Figure 4.3) (Angeletti, 2017). Ceci permet d'analyser le rapport  $m/z$  des protéines ribosomales qui sont spécifiques d'une espèce à une autre. Sur la Figure 4.4, on distingue bien les profils protéiques différents entre plusieurs espèces du genre *Nocardia*. C'est la confrontation entre le spectre obtenu pour un échantillon et les spectres présents dans la base de données qui permet l'identification bactérienne (Clark *et al.*, 2013).

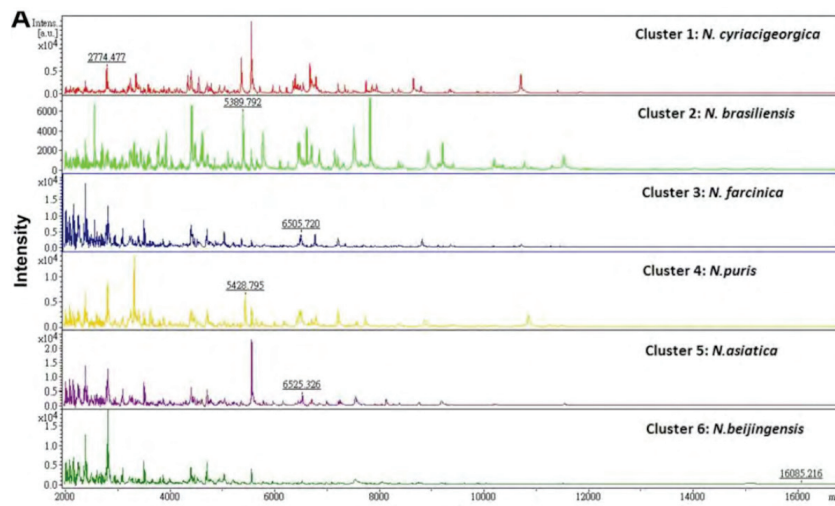


Le MALDI-ToF MS s'est rapidement imposé comme la nouvelle méthode alternative pour l'identification bactérienne et fongique rapide en routine dans les laboratoires de microbiologie. En effet, après un temps de culture moyen de 18-24h pour les bactéries les plus courantes, il faut compter 18-24h supplémentaires pour l'identification avec les techniques actuelles (méthodes moléculaires et de phénotypage). Ce temps est largement augmenté pour les bactéries à croissance lente telles que les *Nocardia* ou les mycobactéries (Angeletti, 2017). La rapidité d'identification du microorganisme est primordiale pour adapter le traitement du patient, notamment dans le cas d'une septicémie (Dellinger *et al.*, 2012). Le MALDI-ToF MS permet une identification en moins d'une heure une fois la bactérie isolée et une faible quantité est suffisante. Le système étant automatisé, il est possible de passer plus de 1000 échantillons par jour sur un seul appareil. Ce temps réduit d'analyse fait gagner du temps personnel technique et limite également les coûts de consommables. Tan *et al.*, (2012) estiment les gains financiers à environ 57 % et une rentabilisation de l'investissement de départ sur l'appareil en moins de trois ans.

Des développements méthodologiques commencent à mettre en avant de nouvelles possibilités avec le MALDI-ToF MS, et notamment l'antibiorésistance directement à partir d'hémocultures. La technique n'est pas encore au point mais il paraîtrait possible d'identifier les déterminants de résistance aux carbapénèmes chez les *Enterobacteriaceae* ou les levures résistantes au triazole (Chong *et al.*, 2015 ; Papagiannitsis *et al.*, 2015 ; Mirande *et al.*, 2015 ; Saracli *et al.*, 2015).



**Figure 4.3.** Principe de fonctionnement du MALDI-ToF MS (d'après <http://disciplines.ac-montpellier.fr/biotechnologies/ressources/microbiologie/identification-de-micro-organismes-par-spectrometrie-de-masse-maldi-tof-ms>)



**Figure 4.4.** Spectres de masse de différentes espèces de *Nocardia* réalisés à l'aide du MALDI-ToF MS Bruker BioTyper (d'après [Hsueh et al., 2014](#))

Malheureusement, la présence d'acides mycoliques dans la paroi de *Nocardia* et de *Mycobacterium* rend l'ionisation des protéines membranaires difficile, ce qui donne des spectres de mauvaise qualité ([Dunne et al., 2014](#)). Une étape préliminaire d'extraction de ces protéines est donc nécessaire ([Carrasco et al., 2016](#)). De plus, la culture de ces bactéries est compliquée, notamment du fait des bactéries incrustées dans la gélose, l'utilisation de milieux de cultures très riches ou encore la croissance lente. Il faut compter 2 à 21 jours de culture pour *Nocardia*, 7 à 21 jours pour les mycobactéries atypiques (à croissance rapide) ou 28 jours pour *Mycobacterium tuberculosis*. En effet, ce dernier point fait débat puisque certains auteurs affirment que l'utilisation d'un milieu de culture non homologué par le constructeur (autre que ceux utilisés pour réaliser la base de données) conduit à une très mauvaise identification ([Verroken et al., 2010](#) ; [McTaggart et al., 2018](#)). Enfin, la dernière limitation à cette technologie est le faible nombre d'espèces et de représentants de chaque espèce qui sont présents dans les bases de données, ce qui peut entraîner des erreurs d'identification, notamment au niveau des complexes d'espèces. En effet, [Blosser et al., \(2016\)](#) ont trouvé des difficultés du MALDI-ToF MS Bruker BioTyper à discriminer les espèces du complexe *N. nova*, *N. brevicatena*, *N. paucivorans* et *N. tranvalensis*. [Girard et al., \(2016\)](#) ont fait état du même problème avec le MADI-ToF Vitek® MS IVD. Ici, ce sont les espèces *N. nova* et *N. africana* qui ne peuvent pas être différenciées et l'appareil donne comme résultat « *N. nova* 50 %/*N. africana* 50 % ». Des erreurs d'identification peuvent également apparaître comme dans l'étude de [Girard et al., \(2017\)](#) où un isolat de *N. asteroides* a été identifié en tant que *N. neocaledoniensis*. Cependant, ces erreurs se produisent sur des espèces très proches phylogénétiquement. Les industriels essayent actuellement de remédier à cette limitation en implémentant de nouvelles espèces et plus de souches à leurs bases de données ([Girard et al., 2017](#)). Des exemples d'auteurs ayant créé des bases de données « maison » donnent des résultats très encourageants pour les espèces incrustées à leur base de données ([Paściak](#)

*et al.*, 2015). Cette technique, du fait des biais d'identification au niveau de certaines espèces ou complexes d'espèces très proches phylogénétiquement, n'est pour le moment que très peu utilisée en routine pour l'identification de *Nocardia*. Cependant, certains « case report » font état de l'utilisation de cette méthode d'identification en parallèle d'une identification moléculaire pour établir le bon diagnostic de la nocardiose (*Arjun et al.*, 2016 ; *Trastoy et al.*, 2017).

A l'heure actuelle, deux industriels se partagent le marché mondial du MALDI-ToF MS, le Français bioMérieux avec son système Vitek® MS et l'Allemand Bruker Daltonics avec sa gamme d'analyseurs Microflex BioTyper. Malgré une technologie semblable, les deux constructeurs se distinguent par les algorithmes d'identification, la construction et la constitution de leur base de données ainsi que les critères d'identification. Cependant, ils affichent tous les deux des résultats comparables pour les espèces les plus courantes (*Lévesque et al.*, 2015).

### 4.5. Traitement

En raison de la gravité des nocardioses et notamment des formes cérébrales et disséminées, un traitement approprié doit être mis en place au plus vite. Des études ont démontré que la mortalité était directement liée à l'efficacité et à la rapidité de la prise en charge thérapeutique des patients (*Anagnostou et al.*, 2014). Dans le cas d'une nocardiose, deux types de traitements peuvent être mis en place : (i) un traitement probabiliste et (ii) un traitement spécifique.

Le traitement probabiliste est mis en place en première intention lorsque le diagnostic de la nocardiose est posé mais que la souche n'a pas été identifiée à l'espèce et/ou que l'antibiogramme n'a pas été réalisé. Pour les raisons évoquées précédemment, il n'est pas toujours possible d'isoler la souche de *Nocardia* impliquée et un second (voire plusieurs) prélèvement peut être nécessaire. Afin d'éviter que l'état du patient (généralement déjà critique) ne se détériore, il est nécessaire de mettre en place un traitement de première intention. Généralement, c'est une monothérapie à base de sulfaméthoxazole-triméthoprime (SMT-TMP) ou une bithérapie combinant le SMT-TMP et l'amikacine qui sont des antibiotiques actifs contre la grande majorité des espèces pathogènes du genre *Nocardia*.

Le traitement spécifique est mis en place une fois que la souche a été identifiée et qu'un antibiogramme a été réalisé. Cependant, dû à une faible prévalence de la nocardiose, aucune étude rétrospective n'a pu être menée afin d'évaluer au mieux les différents traitements à la portée des praticiens. Les résultats sont donc empiriques et basés sur des études *in vitro*. Ceci montre bien la nécessité de réaliser l'antibiogramme dès que cela est possible (*Durand & Rodriguez-Nava*, 2019). Les cliniciens ont généralement recours à des traitements lourds, à savoir des bi- voire des trithérapies faisant appel à de l'amikacine et/ou de l'imipénème ou de la céphalosporine et/ou du sulfaméthoxazole-triméthoprime pendant

plusieurs mois ([Brown-Elliott et al., 2015](#)). Cependant, certaines espèces/souches peuvent présenter des résistances à ces antibiotiques ([Schlaberg et al., 2015](#)). Il est également nécessaire d'avoir d'autres antibiotiques à disposition en cas d'intolérance ou d'allergie du patient pour le traitement proposé. Ces deux points illustrent la nécessité pour laquelle un antibiogramme doit être réalisé dans la mesure du possible, même si la souche impliquée dans la nocardiose a au préalable été identifiée et que le profil de sensibilité aux antibiotiques est connu pour ladite espèce.

Une bithérapie est généralement mise en place pendant deux à quatre semaines par voie intraveineuse puis elle est remplacée par un traitement *per os* (par voie orale) dans la mesure du possible durant six mois et jusqu'à un an dans le cas d'une nocardiose cérébrale ou disséminée chez un patient fortement immunodéprimé. La durée du traitement dépend également de l'état immunitaire du patient : plus son système immunitaire sera affaibli, plus la durée de traitement sera allongée ([Fatahi-Bafghi, 2018](#)).

### 5. *Nocardia cyriacigeorgica*, une espèce pathogène modèle pour l'homme

#### 5.1. Généralités

L'espèce *Nocardia cyriacigeorgica* a été isolée chez un patient Allemand atteint d'une bronchite chronique et décrite par [Yassin et al., \(2001a\)](#) [Yassin et al., \(2001a\)](#). Le nom de l'espèce est dérivé du quartier Gelsenkirchen en Rhénanie du Nord Westphalie où est situé l'hôpital. Le terme Gelsenkirchen est lui-même issu de la contraction des mots *cyriaci* « Eglise » et *georgikos* « agriculture ». Cette espèce a été rattachée en 2006 par [Conville et al., \(2006\)](#) au complexe *N. asteroides* drug pattern type VI initialement décrit par [Wallace et al., \(1988\)](#). *N. cyriacigeorgica* est l'une des espèces les plus impliquées dans la nocardiose à l'échelle mondiale, notamment au Canada ([Elsayed et al., 2006](#)), en Espagne ([Valdezate et al., 2016](#)), aux Etats-Unis d'Amérique ([Schlaberg et al., 2008](#)), en France ([Lebeaux et al., 2018](#)), en Grèce ([Maraki et al., 2006](#)), en Inde ([Aggarwal et al., 2015](#)), à Taïwan ([Chen et al., 2013](#)) ou encore en Turquie ([Akcaglar et al., 2008](#)) (**Tableau 4.1**).

La souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2 a été isolée d'un cas fatal de nocardiose à la suite d'une greffe de rein dans les années 1970 aux Etats-Unis (Georgetown University Hospital (GUH), Washington D.C.) ([Beaman & Maslan, 1978](#)). Elle est apparue sous le nom de *N. asteroides* GUH-2 car l'espèce *N. cyriacigeorgica* n'avait pas encore été décrite par [Yassin et al., \(2001a\)](#). Elle a été largement étudiée, notamment par Beaman et ses collègues. Elle est donc naturellement devenue un modèle pour l'évaluation des mécanismes de virulence et d'invasion des espèces pathogènes du genre *Nocardia*, en témoignent les 50 articles sur PubMed dont elle fait l'objet (consulté le 4 Septembre 2019). Parmi ces articles, plus de la moitié sont des travaux de physiopathologie réalisés sur modèle murin (28 articles) tandis que les travaux sur modèles cellulaires sont plus rares (7 articles). A l'origine, les premiers travaux ciblaient principalement les poumons (7 articles) mais plus tard il se sont largement intéressés au cerveau (14 articles).

## 5.2. Diversité infra-spécifique de *N. cyriacigeorgica*

L'espèce *N. asteroides*, isolée pour la première fois en 1890 par Hans Eppinger (Eppinger, 1890) et décrite comme *Cladothrix asteroides* a été renommée en 1896 *Nocardia asteroides* (Blanchard, 1896) et depuis, elle a connu plusieurs réorganisations au cours du temps. Elle a été divisée une première fois en 6 « drug pattern » par Wallace *et al.*, (1988). Ces « drug pattern » correspondent maintenant à des espèces distinctes de *Nocardia*, comme *N. asteroides* drug pattern type I aujourd'hui connue sous le nom de *N. abscessus*. L'espèce *N. cyriacigeorgica* dérive de *N. asteroides* type VI. Cependant, la description de l'espèce *N. cyriacigeorgica sensus stricto* n'a été faite que 13 ans plus tard (Yassin *et al.*, 2001a).

Seulement 7 ans après la description de l'espèce *N. cyriacigeorgica*, Robert Schlaberg et ses collègues ont démontré une forte diversité infra-spécifique lors d'une étude sur l'épidémiologie de la nocardiose aux Etats-Unis (Schlaberg *et al.*, 2008). Ils ont ainsi décrit 3 « génotypes » à partir de la concaténation des séquences du gène *rrs* et du gène *hsp65* (figure 5.1A). Lors de ces travaux, ils évoquaient d'ailleurs l'émergence de *N. cyriacigeorgica* en tant que pathogène puisque de plus en plus de souches de cette espèce étaient isolées chez des patients aux Etats Unis (Schlaberg *et al.*, 2008). Cependant, ils ne prenaient pas en considération les changements taxonomiques liés à *N. asteroides* type VI. En effet, il s'agissait tout simplement d'une espèce déjà existante mais renommée ultérieurement. Le lien entre les « deux espèces » n'a été fait qu'en 2008 (Witebsky *et al.*, 2008).

Mc Taggart *et al.*, (2010) ont proposé la MLSA comme outil robuste permettant de délimiter une espèce de façon précise chez le genre *Nocardia*. Leur étude, basée sur 237 souches représentant 35 espèces ou complexes d'espèces, incluait 43 souches de *N. cyriacigeorgica*. Le grand nombre de souches de cette espèce a permis de mettre en évidence une forte diversité infra-spécifique par la concaténation de cinq gènes (*gyrB-rrs-secA1-hsp65-rpoB*) (Figure 5.1B), confirmant les observations initiales de Schlaberg *et al.*, (2008). Dans leurs travaux, ils ont retrouvé 3 clusters nommés A, B et C au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* et qui présentaient de fortes valeurs de bootstrap (99, 100 et 100) pour chaque groupe phylogénétique. Malheureusement, la souche type DSM 44484<sup>T</sup> représentant l'espèce ainsi que la souche de référence GUH-2 souvent utilisée comme modèle dans des études évaluant la virulence étaient absentes de ces analyses et à ce jour il est impossible de connaître leur emplacement phylogénétique par rapport à ces trois génotypes décrits (Schlaberg *et al.*, 2008).

Dans une étude sur l'épidémiologie de la nocardiose en Inde sur la période 2006-2014, par concaténation des gènes *rrs* et *hsp65*, Rudramurthy *et al.*, (2015) ont observé cette même distribution en trois groupes mais avec un faible nombre de souches (seulement 6 *N. cyriacigeorgica*). Ces travaux n'ont permis d'observer que les génotypes 1 et 2, le 3 étant représenté par une séquence issue de l'étude de Schlaberg *et al.*, (2008) (Figure 5.1C). Enfin, Xiao *et al.*, (2016) ont également comparé par MLSA des souches isolées chez des patients à

l'aide d'une concaténation des gènes *rrs-gyrB-secA1-hsp65-rpoB* et ont également retrouvé les 3 génotypes décrits précédemment. Dans ces deux études, des arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide du gène *hsp65*, ce qui leur a permis d'inclure les séquences issues de l'article de [Schlaberg et al., \(2008\)](#) disponibles sur PubMed (**Figure 5.1D**).

Cependant, ces études restent relativement superficielles et descriptives. En effet, chaque article ne dispose tout au mieux que d'une dizaine de souches, toutes issues d'une seule étude épidémiologique et d'une région donnée. Seule la souche type de l'espèce *N. cyriacigeorgica* DSM 44484<sup>T</sup> a été ajoutée aux arbres phylogénétiques (**Figure 5.1 A, C et D**). Cela serait pourtant intéressant d'étudier les caractéristiques spécifiques en termes de virulence et ou d'antibiorésistance de chaque génotype décrit afin d'établir une éventuelle prise en charge thérapeutique appropriée. De même, il aurait été intéressant de voir où se situe la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2 tant étudiée par Beaman et ses collègues.



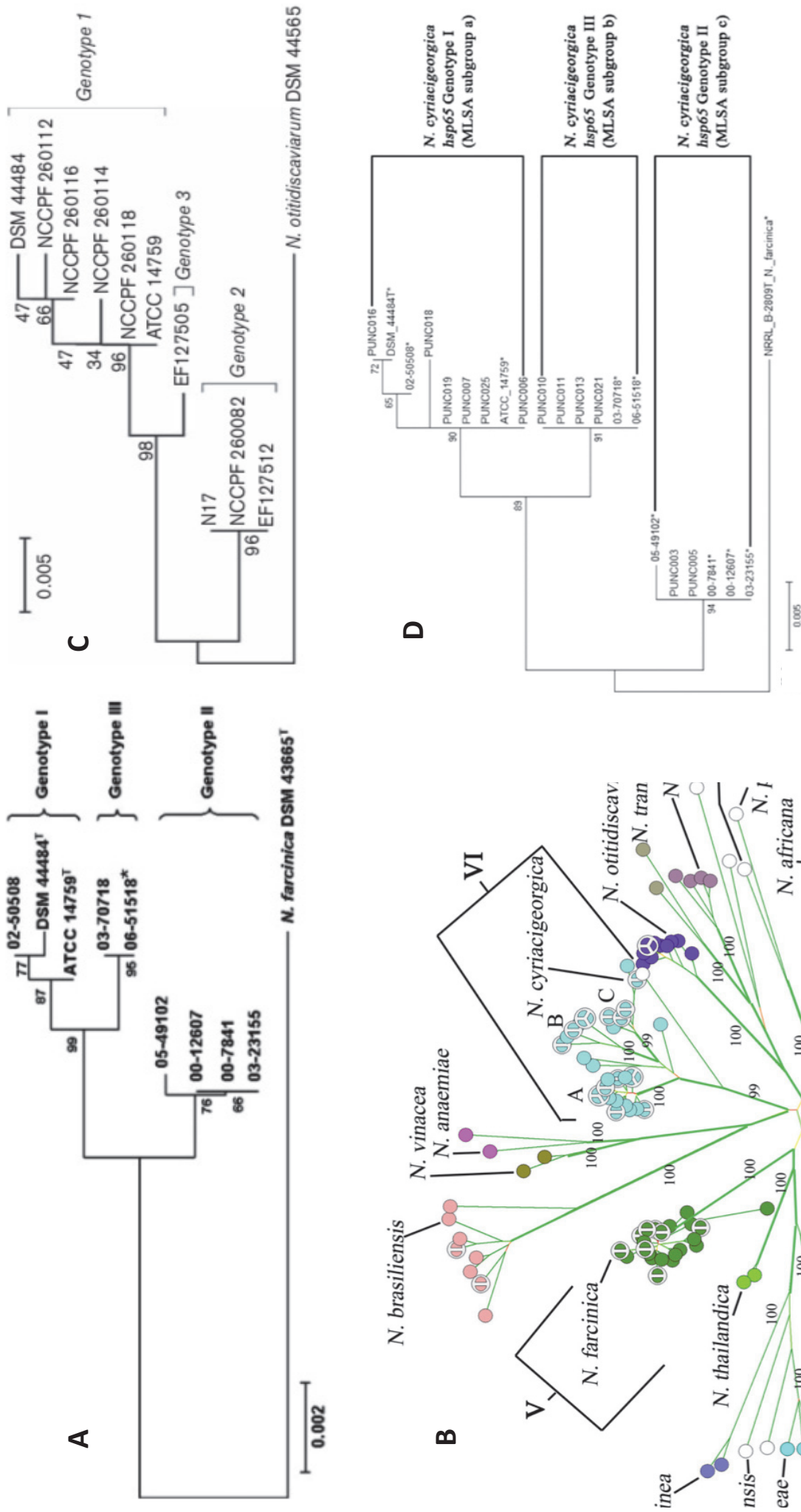


Figure 5.1. Phylogénie de *Nocardia cyriacigeorgica* montrant la diversité infra-spécifique. Les trois génotypes ont été décrits par (A) Schlager *et al.*, (2008), (B) McTaggart *et al.*, (2010), (C) Rudramurthy *et al.*, (2015) et (D) Xiao *et al.*, (2016)

### 5.3. Physiopathologie de *N. cyriacigeorgica* GUH-2

La souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2 est apparue pour la première fois dans un article démontrant que le stade de développement de la bactérie a un impact sur la virulence. En effet, en phase exponentielle de croissance, *i.e.* lorsque les bactéries sont sous forme filamenteuse, les cellules sont alors 1000 fois plus virulentes que ces mêmes bactéries en phase coccoïde lorsqu'elles sont inoculées à la même concentration après une injection intraveineuse sur des souris (Beaman & Maslan, 1978). Les auteurs suggèrent que les modifications de la composition de la paroi cellulaire en fonction du stade de croissance pourraient avoir un impact direct sur la virulence de *Nocardia*.

D'autre part Beaman & Bourgeois (1980 ; 1981) ont démontré la présence d'une forme-L chez *N. cyriacigeorgica* qui jouerait également un rôle important dans la virulence. Or cette forme-L correspond à une forme particulière où la bactérie ne possède pas ou peu de paroi cellulaire. Ceci permet à la bactérie d'induire une phase de latence dans les infections à *Nocardia*. En effet, lorsque des bactéries pénètrent dans l'organisme, le système immunitaire fait intervenir les macrophages afin d'endiguer une éventuelle infection. En revanche, lorsque la bactérie permute vers la forme-L, les macrophages ne sont pas capables de la détecter car ils ne peuvent pas les reconnaître du fait de l'absence de la paroi bactérienne. Une fois les formes « parentes » éliminées par les macrophages (les formes « classiques » de la bactérie, en opposition à la forme-L), les bactéries de forme-L sont capables de se régénérer pour redonner des formes parentes et ainsi se développer et disséminer dans l'organisme. La forme-L permet également une persistance à l'intérieur des macrophages pulmonaires sous forme cryptique et induirait donc des nocardioses pulmonaires chroniques (Filice *et al.*, 1980). Cette forme-L induirait également une résistance aux pénicillines notamment car la perméabilité de la membrane plasmique s'en trouve fortement changée. De même que pour les macrophages, une fois le traitement achevé, les formes-L peuvent redonner des formes parentes (Beaman & Bourgeois, 1981 ; Bourgeois & Beaman, 1980).

D'autres facteurs intervenant dans la virulence de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 ont été déjà bien décrits notamment l'implication de la *sod* (superoxide dismutase) dans la protection de la bactérie contre les attaques du stress oxydatif de son hôte lors d'une infection (Beaman & Beaman, 1990). En effet, la *sod* permet de capter les radicaux superoxyde des molécules d'oxygène (qui sont toxiques pour la bactérie) à l'aide de trois ions métalliques (Fe, Mn et Zn). Seules les souches pathogènes du genre *Nocardia* sont capables de sécréter de la SOD dans le milieu de culture et à des concentrations plus importantes lors de la phase exponentielle de croissance que lors de la phase stationnaire, expliquant en partie le facteur 1000 de différence de virulence entre ces deux phases de croissance (Beaman *et al.*, 1982).

Une étude récente démontre que *N. cyriacigeorgica* est capable d'adhérer, de pénétrer et d'envahir les cellules épithéliales de mamelles bovines en causant une cassure de la membrane cellulaire puis une dégénération mitochondriale. Cette mort de la cellule hôte

est induite *via* un mécanisme d'apoptose lié à la cascade des caspases à l'aide d'un relargage de LDH notamment (Chen *et al.*, 2017). L'étude des protéines impliquées dans des étapes clés du processus infectieux avait déjà été évoquée par Beaman & Beaman (1996). Ils ont mis en évidence une protéine de 43-kDa présente dans la paroi de *N. cyriacigeorgica* lors de sa phase filamenteuse et ayant un rôle important dans l'adhérence des cellules épithéliales pulmonaires ainsi que des cellules HeLa (une lignée cellulaire cancéreuse) (Beaman & Beaman, 1998). L'implication de cette protéine dans les mécanismes d'adhésion de la bactérie aux tissus pulmonaires a été confirmée par un antisérum ciblant l'antigène de 43-kDa. Les résultats ont clairement mis en évidence une inhibition dans l'adhésion de la partie apicale de la forme filamenteuse dans les tissus, empêchant ainsi la pénétration de la bactérie dans la cellule (Beaman & Beaman, 1998).

D'autre part, les travaux de séquençage et d'annotation du génome de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 par Zoropogui *et al.*, (2012 ; 2013) ont aussi permis de mettre en évidence la présence de plusieurs gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes d'adhésion et de virulence de cette espèce. D'ailleurs, plusieurs de ces gènes tels que ceux de la famille *mce* (mammalian cell entry) ont déjà été largement étudiés chez *M. tuberculosis*, démontrant que les gènes *mce* étaient impliqués dans l'invasion cellulaire (Zhang & Xie, 2011 ; Singh *et al.*, 2016). Ces gènes sont notamment impliqués dans la survie à long terme de la bactérie en utilisant le cholestérol de l'hôte comme source de carbone et d'énergie (George *et al.*, 2015 ; Khan *et al.*, 2016 ; Garcia-Fernandez *et al.*, 2017). Ces observations ciblent particulièrement le rôle du locus *mce4* comme facteur de virulence dans les modèles animaux en lien avec l'absorption du cholestérol. Plusieurs auteurs évoquant que le cholestérol de l'hôte serait donc impliqué dans le développement de l'infection à *M. tuberculosis* et qu'une teneur élevée dans l'alimentation pourrait augmenter considérablement la charge bactérienne dans les poumons (Bonds & Sampson, 2018 ; Sinha *et al.*, 2018). D'autres travaux indiquent cependant que le cholestérol n'est pas nécessaire pour établir l'infection, mais semble plutôt être essentiel pour la persistance dans les poumons et pour la croissance au sein des macrophages (Vermeulen *et al.*, 2017).

D'autres gènes tels que les *mbtC/D*, *irp1* et *wcbR/T* qui codent pour trois types de PKS (polyketide synthase) font partie du patrimoine génétique de *N. cyriacigeorgica* et peuvent aussi avoir un rôle important dans le pouvoir pathogène de cette bactérie. Le gène *mbt* est impliqué dans la synthèse de la mycobactine, un chélateur du fer qui favorise le développement des bactéries à croissance lente dans les environnements où le fer est limitant, comme par exemple dans les poumons (McMahon *et al.*, 2012 ; Quadri *et al.*, 1998 ; Rodriguez & Smith, 2006). Le gène *irp*, complémentaire à *mbt*, code pour des protéines de régulation du fer impliquées dans l'absorption, le transport et le stockage du fer (Zhou & Tam, 2017). Et enfin l'opéron *wcb* est un PKS de type I (Cuccui *et al.*, 2012 ; Della Sala Gerardo *et al.*, 2013) impliqué dans la production de polysaccharides capsulaires capables d'inhiber une action antibactérienne dans le sérum humain comme l'ont déjà démontré Warawa *et al.*, (2009) avec *Burkholderia pseudomallei*.

Quant aux PE\_PGRS et aux lipoprotéines, ce sont également des CDS de virulence largement retrouvés chez *N. cyriacigeorgica* GUH-2. [Becker & Sander \(2016\)](#) ont démontré l'importance des lipoprotéines dans les mécanismes de virulence aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Ces lipoprotéines permettaient la survie de *Mycobacterium smegmatis* dans les macrophages et dans les cellules pulmonaires de souris ([Li et al., 2018](#)). De très nombreux PE\_PGRS existent et des travaux ont démontré l'implication du PE\_PGRS33 dans l'entrée et l'immuno-modulation dans les macrophages ([Camassa et al., 2017](#)), l'implication du PE\_PGRS41 dans la survie intracellulaire à l'intérieur des macrophages ([Deng et al., 2017](#)) ou encore le PE\_PGRS30 qui supprime la réaction pro-inflammatoire dans les macrophages ([Chatrath et al., 2016](#)).

De plus, de nombreux travaux réalisés par Blaine Beaman et ses collaborateurs ont contribué à la compréhension des mécanismes pathogéniques de *N. cyriacigeorgica* lors de l'infection cérébrale. En effet, il faut savoir que le cerveau est un site fréquent d'atteintes dues à *Nocardia*. Les infections cérébrales se rencontrent dans 23 à 33 % des nocardioses et sont les plus souvent secondaires à un foyer pulmonaire ([Rodriguez-Nava et al., 2019](#)). La grande majorité des travaux de Beaman pendant sa carrière professionnelle a porté sur l'étude de la souche *N. cyriacigeorgica* GUH-2. Ces travaux ont démontré la capacité de cette souche à envahir le cerveau et à provoquer des troubles parkinsoniens chez des souris injectées par voie intraveineuse à des doses non létales ([Beaman & Tam, 2008](#)). Les symptômes induits par la bactérie sont semblables à ceux de la maladie de Parkinson, à savoir des mouvements de la tête de type oui-oui, une rigidité, une posture courbée, une dyskinésie, une rétropulsion et une position anormale de la queue.

L'idée des symptômes parkinsoniens liés à la présence de *Nocardia* a été reprise par [Bernardin Souibgui et al., \(2017a\)](#) afin de démontrer le rôle de la bactérie dans la dégénérescence des neurones dopaminergique sur le nématode *Caenorhabditis elegans*. L'étude a été réalisée à partir des surnageants bactériens, permettant ainsi la mise en évidence de l'implication des métabolites secondaires produits par les bactéries dans les mécanismes de neuro-dégénérescence.

Dans la continuité des études précédemment citées, des travaux préliminaires sur l'étude des mécanismes de virulence impliqués lors de l'infection cérébrale ou pulmonaire ont été réalisés récemment au sein de notre équipe de recherche et menés par l'OFN avec des collaborations étroites avec le Pr Vanessa Louzier (VetAgro Sup, Marcy l'Etoile). Les résultats obtenus à ce jour montrent l'appropriation du modèle murin par l'injection intraveineuse (IV) de souches de *Nocardia* par la queue comme proposé par Beaman ([Beaman, 1992](#)) mais également par injections dans œil ou intra-pulmonaire comme l'ont démontré les travaux de cette collaboration. Ces modèles sont utilisés à ce jour pour suivre la physiopathologie de *N. cyriacigeorgica* et *N. abscessus*, deux espèces pathogènes d'importance en pathologie humaine d'après les données épidémiologiques de l'OFN ([Lebeaux et al, 2019](#)). L'originalité de ses travaux repose sur l'étude de clones environnementaux comparés avec des clones cliniques bien connus par l'OFN afin de pouvoir détecter ceux présentant un risque potentiel

d'induction d'infections graves dans des environnements urbains pollués. Lors de mes recherches sur la biodiversité de *Nocardia* dans des environnements pollués, j'ai pu isoler pour la première fois plusieurs souches d'espèces pathogènes qui sont incluses dans ces études afin d'évaluer leur virulence dans des modèles murins et cellulaires.

## **6. Conclusion**

Comme nous venons de le voir dans ce chapitre, l'imperméabilisation des sols en ville modifie le cycle de l'eau et impose des nouvelles pratiques pour infiltrer ce surplus d'eaux pluviales que les stations d'épuration ne peuvent pas traiter. Lorsque l'exutoire final des eaux pluviales se trouve être un bassin d'infiltration, de fortes teneurs de polluants (HAP, PCB, POP, pesticides) sont retrouvées dans les sédiments urbains de ces bassins. Cet environnement représente une niche écologique intéressante pour de nombreux phyla, notamment celui des Actinobactéries comportant de nombreux genres capables de dégrader ces polluants. Parmi elles, on retrouve les *Nocardia*, un genre bactérien versatile, capable de se développer aussi bien dans ces environnements pollués que chez l'hôte humain, causant alors la nocardiose. Cette maladie reste pour le moment difficile à diagnostiquer du fait de sa faible prévalence, de verrous technologiques pour son identification et du manque de connaissances sur ses niches écologiques précises.

**CHAPITRE II**

**PHYLOGENIE PHYSIOPATHOLOGIE DE**  
**SOUCHES URBAINES DE *NOCARDIA***  
***CYRIACIGEORGICA***





### Préambule

Les *Nocardia* sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement comportant une centaine d'espèces et dont environ la moitié est pathogène (Schlaberg *et al.*, 2008 ; Tamura *et al.*, 2018). Certaines espèces sont responsables de la nocardiose, une maladie granulomateuse et suppurative, affectant principalement les patients immunodéprimés. Cette maladie, considérée comme rare, affecterait en réalité bien plus de personnes qu'il n'y paraît, soit environ un million par an à travers le monde selon Pujic *et al.*, (2015), mais demeure encore bien trop souvent mal ou non diagnostiquée (Rodriguez-Nava *et al.*, 2019). Parmi ces espèces pathogènes, *N. cyriacigeorgica* fait partie des plus impliquées dans la nocardiose à l'échelle mondiale avec une incidence comprise entre 10 et 25 % des cas dans la plupart des pays. De plus, chez les bovins, elle est également responsable d'infections graves provoquant une contamination du lait entraînant des pertes économiques pour la filière laitière (Chen *et al.*, 2017).

En termes de taxonomie, l'espèce pathogène *N. cyriacigeorgica* a été décrite pour la première fois en 2001 mais découle historiquement du complexe *N. asteroides* drug pattern type VI. En 2008, une variabilité infraspécifique avait été démontrée, conduisant à la description de trois génotypes. Cependant, des travaux sont encore nécessaires pour expliquer cette variabilité ainsi que les conséquences que cela pourrait avoir en terme de virulence ou de résistance aux antibiotiques. En ce qui concerne son réservoir environnemental, plusieurs travaux indiquent sa présence dans des environnements contaminés aux hydrocarbures.

Parmi ces environnements pollués, se trouve le cas particulier de la ville. En effet, l'activité humaine et une population très dense produisent de très nombreux polluants de types hydrocarbures, matières organiques, métaux lourds et les concentrent en une surface réduite. A cela s'ajoute la stratégie de gestion des eaux pluviales qui consiste généralement à infiltrer les eaux de surface. Cependant, les polluants lessivés sous forme particulière lors du ruissellement s'accumulent dans des réceptacles d'eaux pluviales, souvent des bassins d'infiltration, représentant une nouvelle niche écologique pour les bactéries capables de les dégrader.

Le bassin d'infiltration Django-Reinhardt, par la forte hétérogénéité des gradients de polluants (HAP, ETM...) et d'humidité qu'il présente, est un bon modèle d'étude pour évaluer la variabilité spatio-temporelle des paramètres physico-chimiques dans des sédiments urbains et l'influence qui en résulte sur les communautés de *Nocardia*. En effet, ce type de système, de par sa grande variété de paramètres physico chimiques, nous permet d'avoir, en un seul lieu, des environnements présentant des caractéristiques diverses qu'on peut retrouver dans d'autres environnements urbains tels que des zones humides en villes (lacs publics) ou des espaces verts. Dans cette étude, nous avons proposé d'étudier les relations phylogénétiques entre des souches d'origine urbaine isolées à partir des sédiments du bassin d'infiltration

Django-Reinhardt où la présence de HAP et d'ETM a déjà été documentée, et des souches cliniques dont la plupart sont issues de patients Français. Pour cela, une analyse de MLSA faisant appel à la concaténation de 4 gènes de ménage (ARNr *rrs-hsp65-sodA-secA1*) a été réalisée. Cette étude avait comme objectif principal de mettre en lumière la possibilité que des souches urbaines du bassin d'infiltration se retrouvent phylogénétiquement proches de souches cliniques, suggérant une circulation de *N. cyriacigeorgica* à travers des environnements pollués et qui seraient à l'origine de nocardioses.

Malgré la détection de *N. cyriacigeorgica* dans des environnements pollués aux hydrocarbures, aucune étude sur la physiopathologie de ce type d'isolat de cette espèce n'a été réalisée. Pour cette raison, les risques pour la santé associés à la présence de cette espèce dans l'environnement restent encore méconnus. Nous avons voulu répondre à l'hypothèse que les souches d'origine clinique de *N. cyriacigeorgica* présentent une plus forte virulence par rapport aux souches d'origine environnementale, mais qu'une contamination des patients par des clones environnementaux n'est pas à exclure. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis en place un suivi de la virulence sur deux souches de *N. cyriacigeorgica*, une clinique et une environnementale, provenant des deux génotypes les plus distincts (phylogroupe II (PII) et phylogroupe III (PIII) : GUH-2 (clinique – PII) et EML446 (bassin d'infiltration DjR – PIII) sur un modèle murin d'immunoparalysie transitoire (CLP 30 %) et par génomique comparative. Pour compléter cette étude sur le pouvoir pathogène de souches urbaines de *N. cyriacigeorgica* issues du bassin d'infiltration, nous avons réalisé le séquençage complet de trois génomes de l'espèce *N. cyriacigeorgica* afin d'avoir un exemplaire de chaque phylogroupe ainsi qu'un génome du représentant du genre *Nocardia* le plus proche phylogénétiquement de cette espèce, *i.e.* *N. asteroides* ATCC 19247<sup>T</sup>.

Ces travaux sur la biodiversité spatiotemporelle de *Nocardia* et plus particulièrement de *N. cyriacigeorgica* ainsi que sa phylogénie et sa physiopathologie sur un modèle murin ont été valorisés dans un article intitulé « Health hazards associated with *Nocardia* cells colonizing urban infiltration systems », soumis dans la revue *Environmental Health Perspectives*. Les résultats de séquençage de génomes ont quant à eux été présentés dans un article d'annonce de génomes intitulé « Genomes sequences of two *N. cyriacigeorgica* environmental isolates, type strains *Nocardia asteroides* ATCC 19247<sup>T</sup> and *Nocardia cyriacigeorgica* DSM 44484<sup>T</sup> » et paru dans la revue « *Microbiology Resource Announcements* ».

## Article 1

# GENOMES SEQUENCES OF TWO *N. CYRIACIGEORGICA* ENVIRONMENTAL ISOLATES, TYPE STRAINS *NOCARDIA* *ASTEROIDES* ATCC 19247<sup>T</sup> AND *NOCARDIA* *CYRIACIGEORGICA* DSM 44484<sup>T</sup>

Florian VAUTRIN<sup>1,2,4</sup>, Emmanuelle BERGERON<sup>1,2</sup>, Audrey DUBOST<sup>1</sup>, Danis ABROUK<sup>1</sup>, Benoit COURNOYER<sup>1</sup>, Vanessa LOUZIER<sup>3</sup>, Thierry WINIARSKI<sup>4</sup>, Veronica RODRIGUEZ-NAVA<sup>1,2</sup>, Petar PUJIC<sup>1</sup>

1. UMR CNRS 5557, INRA 1418, VetAgro Sup, Ecologie Microbienne, Université Lyon-1, Lyon, France
2. Observatoire Français des Nocardioses, Laboratoire de Mycologie, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon-1, Lyon, France
3. APCSe, Agressions Pulmonaire et Cardiovasculaire dans le Sepsis, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France
4. UMR CNRS 5023, ENTPE, Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Vaulx-en-Velin, France

***Publié dans Microbial resource announcement***

***MRA 8 (2019) e00600-19***  
<https://doi.org/10.1128/MRA.00600-19>





GENOME SEQUENCES



## Genome Sequences of Three *Nocardia cyriacigeorgica* Strains and One *Nocardia asteroides* Strain

Florian Vautrin,<sup>a,b,d</sup> Emmanuelle Bergeron,<sup>a,b</sup> Audrey Dubost,<sup>a</sup> Danis Abrouk,<sup>a</sup> Christophe Martin,<sup>a</sup> Benoit Cournoyer,<sup>a</sup> Vanessa Louzier,<sup>c</sup> Thierry Winiarski,<sup>d</sup> Veronica Rodriguez-Nava,<sup>a,b</sup> Petar Pujic<sup>a</sup>

<sup>a</sup>UMR CNRS 5557, INRA 1418 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

<sup>b</sup>Observatoire Français des Nocardioses, Institut des Agents Infectieux (IAI), Centre de Biologie et Pathologie Nord, Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France

<sup>c</sup>Agressions Pulmonaires et Circulatoires dans le Sepsis (APCSe), VetAgro Sup—Campus Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France

<sup>d</sup>UMR CNRS 5023, Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Vaulx-en-Velin, France

**ABSTRACT** We report four draft genome sequences of *Nocardia* spp. The strains are the *Nocardia cyriacigeorgica* DSM 44484 pathogenic type strain; two environmental isolates, *Nocardia cyriacigeorgica* EML446 and EML1456; and the *Nocardia asteroides* ATCC 19247 nonpathogenic type strain, with estimated genome sizes of 6.3 to 6.8 Mb. The study of these isolates will provide insight into physiology, evolution, and pathogenicity of *Nocardia* spp.

Since Edmond Nocard first isolated *Nocardia* spp. in 1888 (1), 92 different species have been described (2). Most of them are pathogenic for human or animal infections worldwide. *Nocardia* spp. are Gram-positive, acid-fast actinobacteria and are ubiquitous in nature (2). Pathogenic *Nocardia* cells can infect different organs in humans, as well as disseminate from a primary infection site, such as the lungs, to distant organs and other sites, including the central nervous system (3). *Nocardia cyriacigeorgica* is one of the most often implicated species in human nocardiosis, including strain GUH-2 (4). This species, which derives from the *Nocardia asteroides* complex drug pattern type VI (5) and was described as *N. cyriacigeorgica* in 2001 (6), seems to be composed of three genotypes (2, 7–9).

Currently, only a few genomes of *N. cyriacigeorgica* strains have been entirely sequenced, and the genome of GUH-2, the model organism to study infections in animals, is the only one that is annotated (10). A genomic comparison of these three genotypes could untangle this clustering and maybe describe a new species within the former *N. asteroides* complex. Four strains have been sequenced, as follows: *Nocardia asteroides* type strain ATCC 19247, the type strain *N. cyriacigeorgica* DSM 44484, and two *N. cyriacigeorgica* environmental strains, EML446 and EML1456, isolated from infiltration basin urban sediments in France (coordinates 45°73'55.01"N, 4°95'74.65"E). Sediment suspensions were prepared according to Maldonado et al. (11), and serial dilutions were inoculated on brain heart infusion (BHI) agar containing cycloheximide.

Strains were grown in BHI medium according to Beaman and Maslan (12), and genomic DNA was extracted from 50 ml cell culture during the exponential-growth phase. Cells were collected by centrifugation and pellet solubilized in 8 ml of 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.2), 5 mg/ml lysozyme, and 10 µg/ml RNase A. After a 1-h period of cell lysis, 8 ml of 2% SDS and 2 mg/ml of proteinase K were added and incubated at 55°C for 5 h. Protein and cellular debris were eliminated by adding 16 ml phenol-chloroform-isoamyl alcohol, 25:24:1 (vol/vol/vol), at pH 8.2. After centrifugation, genomic DNA was precipitated by adding 1.5 ml of 3 M sodium acetate (pH 5.2) and absolute ethanol. Genomic DNA was collected by centrifugation, and the DNA pellet

**Citation** Vautrin F, Bergeron E, Dubost A, Abrouk D, Martin C, Cournoyer B, Louzier V, Winiarski T, Rodriguez-Nava V, Pujic P. 2019. Genome sequences of three *Nocardia cyriacigeorgica* strains and one *Nocardia asteroides* strain. Microbiol Resour Announc 8:e00600-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00600-19>.

**Editor** Irene L. G. Newton, Indiana University, Bloomington

**Copyright** © 2019 Vautrin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Veronica Rodriguez-Nava, [veronica.rodriguez-nava@univ-lyon1.fr](mailto:veronica.rodriguez-nava@univ-lyon1.fr), or Petar Pujic, [petar.pujic@univ-lyon1.fr](mailto:petar.pujic@univ-lyon1.fr).

**Received** 24 May 2019

**Accepted** 21 July 2019

**Published** 15 August 2019



**TABLE 1** Characteristics of draft genomes and accession numbers of *N. asteroides* ATCC 19247<sup>T</sup> and *N. cyriacigeorgica* DSM 44484<sup>T</sup>, EML446, and EML1456

Isolate	BioProject no.	Accession no.	Genome size (Mbp)	G+C content (%)	No. of contigs	No. of reads	<i>N</i> <sub>50</sub> value (Mbp)	Coverage level (×)	No. of CDS <sup>a</sup>	% coding proteins	No. of tRNAs	No. of rRNAs
<i>N. asteroides</i> ATCC 19247 <sup>T</sup>	PRJNA542835	VBUS000000000	6.6	70.0	18	13,451,664	1.51	301	6,498	91.4	50	2
<i>N. cyriacigeorgica</i> EML1456	PRJNA542859	VBUU000000000	6.8	68.0	108	16,883,270	0.15	370	6,906	89.7	49	2
<i>N. cyriacigeorgica</i> EML446	PRJNA542857	VBUT000000000	6.5	68.2	41	18,841,320	0.61	433	6,531	89.91	51	3
<i>N. cyriacigeorgica</i> DSM 44484 <sup>T</sup>	PRJNA542831	VBUR000000000	6.3	58.2	64	10,182,338	0.19	487	6,072	89.8	48	3

<sup>a</sup> CDS, coding sequences.

was washed in 70% ethanol, air dried, and solubilized in 200  $\mu$ l of Tris-EDTA (TE) buffer (pH 8).

The genomes were sequenced using Illumina MiSeq technology by GATC (Mulhouse, France) and Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). Libraries with 2  $\times$  300-bp and 2  $\times$  125-bp reads were constructed for Biofidal and GATC, respectively. The reads were processed using Unicycler v0.4.3 (13), quality controls were assessed with FastQC and Trimmomatic, and contigs shorter than 200 bp were removed, resulting in genomes of 6.6 Mb for *N. asteroides* ATCC 19247<sup>T</sup>, 6.3 Mb for *N. cyriacigeorgica* DSM 44484<sup>T</sup>, 6.5 Mb for *N. cyriacigeorgica* EML446, and 6.8 Mb for *N. cyriacigeorgica* EML1456. The genomes were annotated on MicroScope (14). The characteristics of the draft genomes are summarized in Table 1. These genome sequences provide valuable data to study the ecology, evolution, pathogenicity, phylogeny, and physiology of *Nocardia cyriacigeorgica* complex species.

**Data availability.** This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession numbers listed in Table 1. The versions described in this paper are the first versions. Data for EML446 and EML1456 are available at the CRB-EML (<http://eml-brc.org/> and <https://brclims.pasteur.fr/brcWeb/>).

#### ACKNOWLEDGMENTS

Florian Vautrin held a doctoral fellowship from the region Auvergne-Rhône-Alpes. The LABGeM (CEA/Genoscope and CNRS UMR8030), the France Génomique, and The French Institute of Bioinformatics (funded as part of the Investissement d'Avenir program managed by the Agence Nationale pour la Recherche, contracts ANR-10-INBS-09, ANR-11-INBS-0013) are all thanked for their support to the MicroScope annotation platform.

We thank the Infiltion project ANR-17-CE04-0010-03.

We thank Gonzalo Bermejo Miranda for his English grammar revision and help in the review of the manuscript.

#### REFERENCES

- Nocard E. 1888. Note sur la maladie des bœufs de la Guadeloupe connue sous le nom de farcin. *Ann Inst Pasteur* 2:293–302.
- Schlager R, Huard RC, Della-Latta P. 2008. *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging pathogen in the United States. *J Clin Microbiol* 46:265–273. <https://doi.org/10.1128/JCM.00937-07>.
- Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, Djadi-Prat J, Mounié D, Boiron P, Lortholary O, Rodriguez-Nava V. 2018. Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010–2015. *Clin Microbiol Infect* 25:489–495. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.013>.
- Beaman BL, Maslan S. 1977. Effect of cyclophosphamide on experimental *Nocardia asteroides* infection in mice. *Infect Immun* 16:995–1004.
- Wallace RJ, Steele LC, Sumter G, Smith JM. 1988. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother* 32:1776–1779. <https://doi.org/10.1128/aac.32.12.1776>.
- Yassin AF, Rainey FA, Steiner U. 2001. *Nocardia cyriacigeorgica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1419–1423. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1419>.
- McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. 2010. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 48:4525–4533. <https://doi.org/10.1128/JCM.00883-10>.
- Xiao M, Pang L, Chen S-A, Fan X, Zhang L, Li H-X, Hou X, Cheng J-W, Kong F, Zhao Y-P, Xu Y-C. 2016. Accurate identification of common pathogenic *Nocardia* species: evaluation of a multilocus sequence analysis platform and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 11:e0147487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147487>.
- Rudramurthy SM, Kaur H, Samanta P, Ghosh A, Chakrabarti A, Honnavar P, Ray P. 2015. Molecular identification of clinical *Nocardia* isolates from India. *J Med Microbiol* 64:1216–1225. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000143>.
- Zoropogui A, Pujic P, Normand P, Barbe V, Beaman B, Beaman L, Boiron P, Colinon C, Deredjian A, Graindorge A, Mangenot S, Nazaret S, Neto M, Petit S, Roche D, Vallenet D, Rodriguez-Nava V, Richard Y, Cournoyer B, Blaha D. 2012. Genome sequence of the human- and animal-pathogenic strain *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2. *J Bacteriol* 194:2098–2099. <https://doi.org/10.1128/JB.00161-12>.

11. Maldonado L, Hookey JV, Ward AC, Goodfellow M. 2000. The *Nocardia salmonicida* clade, including descriptions of *Nocardia cummidelens* sp. nov., *Nocardia fluminea* sp. nov. and *Nocardia soli* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78:367–377. <https://doi.org/10.1023/A:1010230632040>.
12. Beaman BL, Maslan S. 1978. Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. *Infect Immun* 20:290–295.
13. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13:e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
14. Vallenet D, Calteau A, Cruveiller S, Gachet M, Lajus A, Josso A, Mercier J, Renaux A, Rollin J, Rouy Z, Roche D, Scarpelli C, Médigue C. 2017. MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* 45: D517–D528. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1101>.



## Article 2

# HEALTH HAZARDS ASSOCIATED WITH *NOCARDIA* CELLS COLONIZING URBAN INFILTRATION SYSTEMS

Florian VAUTRIN<sup>1,4,5</sup>, Petar PUJIC<sup>1</sup>, Christian PAQUET<sup>2</sup>, Emmanuelle BERGERON<sup>1,4</sup>, Delphine MOUNIEE<sup>1</sup>, Thierry MARCHAL<sup>3</sup>, Hélène SALORD<sup>4</sup>, Jeanne-Marie BONNET-GARIN<sup>2</sup>, Benoit COURNOYER<sup>1</sup>, Thierry WINIARSKI<sup>5</sup>, Vanessa LOUZIER<sup>2,\*</sup>, Veronica RODRIGUEZ-NAVA<sup>1,4\*</sup>

1. UMR CNRS 5557, INRA 1418, VetAgro Sup, Ecologie Microbienne, Université Lyon-1, Lyon, France
2. APCSe, Agressions Pulmonaire et Cardiovasculaire dans le Sepsis, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon, Marcy l’Etoile, France
3. Laboratoire Vétérinaire d’Histopathologie, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon, Marcy l’Etoile, France
4. Observatoire Français des Nocardioses, Institut des Agents Infectieux (IAI), Centre de Biologie et Pathologie Nord, Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France
5. UMR CNRS 5023, ENTPE, Laboratoire d’Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Vaulx-en-Velin, France

\* These authors contributed equally to this work

***Soumis dans Environment International***



## Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	ENVINT_2019_4413
<b>Title</b>	Health hazards associated with Nocardia cells colonizing urban infiltration systems
<b>Article type</b>	Research Paper

### Abstract

Urban Infiltration Basins (UIBs) are used to manage urban runoff transfers, and feed aquifers. These UIBs can accumulate urban pollutants, and favor the growth of undesirable biological agents. The Django-Reinhart UIB in Chassieu (Lyon area, France) is a well characterized UIB in terms of chemical pollutants (HPA) used in this study in which bacterial species belonging to Nocardia genus, that may represent a public health risk, have been found. Some of these species can be highly detrimental to individuals who have undergone immunosuppressive therapies or suffer from chronic inflammatory diseases. Objectives: i) To assess the spatio-temporal dynamics of pathogenic Nocardia in UIBs, ii) to define the epidemiological associations between clinical and UIB N. cyriacigeorgica strains, iii) to assess health hazards associated with environmental Nocardia using an animal model, and iv) to identify genetic elements highlighting an on-going adaptation of environmental genotypes to the human host. Methods: A well characterized UIB in terms of chemical pollutants from the Lyon area was used in this study. Cultural and Next-Generation-sequencing methods were used for Nocardia detection and typing. A Multilocus-Sequence-Analysis was performed on clinical and environmental isolates to infer phylogenetic relationships and identify clonal complexes. A murine model of transient immunoparalysis was performed to assess the virulence traits, and comparative genomics was used to detect genes involved in virulence. Results: Up to  $1.0 \times 10^3$  CFU/g sediment of N. cyriacigeorgica and 6 OTUs were retrieved from the studied UIB. Close phylogenetic relationships were found between environmental and clinical strains. One environmental isolate (EML446) showed significant infectivity in mice with pulmonary damages similar to those observed with a highly virulent clinical clone (GUH-2). The environmental strain harbored several virulence genes implicated in well-described infectious processes. Conclusion: N. cyriacigeorgica strains phylogenetically close to clinical strains were isolated from an UIB. The virulence of one of these isolated strains was as high as the one of the well-known GUH-2 clinical strain. This finding indicates that ETM-polluted environments such as UIBs are reservoirs of pathogenic Nocardia.

<b>Keywords</b>	Nocardia; Opportunistic pathogen; Environment; Murine model; PAH urban pollution; hsp65 metabarcoding
<b>Taxonomy</b>	Microorganism Risk Assessment, Human Environmental Health Exposure, Environmental Health Risk Assessment, Diversity of Bacteria
<b>Corresponding Author</b>	Veronica Rodriguez Nava
<b>Corresponding Author's Institution</b>	UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne - Equipe Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement
<b>Order of Authors</b>	Florian Vautrin, Petar Pujic, Christian Paquet, Emmanuelle Bergeron, Delphine Mouniée, Thierry Marchal, Hélène Salord, Jeanne-Marie Bonnet-Garin, Benoit Cournoyer, Thierry Winiarski, Vanessa Louzier, Veronica Rodriguez Nava
<b>Suggested reviewers</b>	Alain Hartman, david mccarthy, Alex VAN BELKUM

## Submission Files Included in this PDF

### File Name [File Type]

Vautrin\_et\_al\_cover\_letter.docx [Cover Letter]

Highlights\_2019\_11\_26b.docx [Highlights]

Vautrin\_et\_al\_2019\_11\_27.docx [Manuscript File]

declaration-of-competing-interests.docx [Conflict of Interest]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

**Health hazards associated with *Nocardia* cells colonizing urban  
infiltration systems**

**COVER LETTER**

Dear Editor,

We would like to submit in your journal Environment International the paper entitled  
**‘Health hazards associated with *Nocardia* cells colonizing urban infiltration systems’**.

In this work, we show the bacterial hazard associated with a kind of stormwater infiltration system (SIS). More precisely, we show for the first time that the highly hydrocarbon-polluted urban sediments from an urban infiltration basin (UIB) can host pathogenic species from *Nocardia*. This may represent a public health concern especially for immunocompromised people or persons affected by chronic pulmonary diseases. *Nocardia* biodiversity in this kind of environment has been described for the first time by using an innovative method (metabarcoding). In parallel, we studied their molecular epidemiology and we identified clonal lineages between clinical and environmental strains of highly pathogenic species *N. cyriacigeorgica*. Moreover, the whole genome sequencing of *N. cyriacigeorgica* from an UIB together with the physiopathological study on a murine model of transient immunoparalysis showed that the studied isolated from the SIS of *N. cyriacigeorgica* was significantly virulent.

The interest of studying UIBs is that, due to their heterogeneity (gradient of pollutants and moisture), they can mimic various environments that can be found in many other different locations, such as urban water areas (blue-zones), green spaces or puddles after a rainfall event.



We think that this paper studies the relationship between the environment and human health and deals with the disciplines 'Human Environmental Health Exposure', 'Microorganism Risk Assessment' and 'Diversity of Bacteria'.

Best regards,



Verónica Rodríguez Nava

**Professeur des Universités**

UMR CNRS 5557 - Observatoire Français des Nocardioses (OFN),

Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon I,

8, Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France.

Phone : + 33 4 78 77 72 76

E-mail : [veronica.rodriquez-nava@univ-lyon1.fr](mailto:veronica.rodriquez-nava@univ-lyon1.fr)

## Highlights

- Trace element metals are favoring development of pathogen *Nocardia* species
- High infraspecific variability within *N. cyriacigeorgica*, forming three phylogroups
- Immunosuppressive window may be enough to infect immunocompetent mice
- Better understand the ecology of *Nocardia* to explain the patients' contamination
- First isolation of *N. cyriacigeorgica* in Europe in a polluted urban environment
- *N. cyriacigeorgica* is more virulent than *P. aeruginosa* in murine model
- Environmental *N. cyriacigeorgica* strains may be as virulent as clinical GUH-2 strain.
- *hsp65* marker can be used by metabarcoding approach for assessment of environmental *Nocardia* biodiversity

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

# Health hazards associated with *Nocardia* cells colonizing urban infiltration systems

Florian Vautrin<sup>a,d,e</sup>, Petar Pujic<sup>a</sup>, Christian Paquet<sup>b</sup>, Emmanuelle Bergeron<sup>a,d</sup>, Delphine Mouniée<sup>a</sup>, Thierry Marchal<sup>c</sup>, Hélène Salord<sup>d</sup>, Jeanne-Marie Bonnet-Garin<sup>b</sup>, Benoit Cournoyer<sup>a</sup>, Thierry Winiarski<sup>e</sup>, Vanessa Louzier<sup>b\*</sup>, Veronica Rodriguez-Nava<sup>a,d\*</sup>

<sup>a</sup> UMR Ecologie Microbienne, CNRS 5557, INRA 1418, Research team on « bacterial opportunistic pathogens and environment », VetAgro Sup and University Lyon 1, F-69363 Lyon, France; <sup>b</sup> APCSe, Agressions Pulmonaires et Cardiovasculaires dans le Sepsis, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l’Etoile, France; <sup>c</sup> Laboratoire vétérinaire d’histopathologie, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l’Etoile, France; <sup>d</sup> Observatoire Français des Nocardioses, Institut des Agents Infectieux (IAI), Centre de Biologie et Pathologie Nord, Hôpital de la Croix-Rousse, 69317 Lyon, France; <sup>e</sup> UMR LEHNA, CNRS 5023, ENTPE, University Lyon 1, F-69622 Villeurbanne, France. \* These authors contributed equally to this work.

**Address correspondence to:** Veronica Rodriguez-Nava, UMR Ecologie Microbienne, CNRS 5557, INRA 1418, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex, France. E-mail: [veronica.rodriguez-nava@univ-lyon1.fr](mailto:veronica.rodriguez-nava@univ-lyon1.fr) and Vanessa Louzier, APCSe, Agressions Pulmonaires et Cardiovasculaires dans le Sepsis, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l’Etoile, France. E-mail: [vanessa.louzier@vetagro-sup.fr](mailto:vanessa.louzier@vetagro-sup.fr)

**Running title:** Environmental pollution and assessment of microbial risk

61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120

## 24    **Abstract**

25    Urban Infiltration Basins (UIBs) are used to manage urban runoff transfers, and feed aquifers.  
26    These UIBs can accumulate urban pollutants, and favor the growth of undesirable biological  
27    agents. The Django-Reinhart UIB in Chassieu (Lyon area, France) is a well characterized UIB  
28    in terms of chemical pollutants (HPA) used in this study in which bacterial species belonging  
29    to *Nocardia* genus, that may represent a public health risk, have been found. Some of these  
30    species can be highly detrimental to individuals who have undergone immunosuppressive  
31    therapies or suffer from chronic inflammatory diseases.

32    **Objectives:** i) To assess the spatio-temporal dynamics of pathogenic *Nocardia* in UIBs, ii) to  
33    define the epidemiological associations between clinical and UIB *N. cyriacigeorgica* strains,  
34    iii) to assess health hazards associated with environmental *Nocardia* using an animal model,  
35    and iv) to identify genetic elements highlighting an on-going adaptation of environmental  
36    genotypes to the human host.

37    **Methods:** A well characterized UIB in terms of chemical pollutants from the Lyon area was  
38    used in this study. Cultural and Next-Generation-sequencing methods were used for *Nocardia*  
39    detection and typing. A Multilocus-Sequence-Analysis was performed on clinical and  
40    environmental isolates to infer phylogenetic relationships and identify clonal complexes. A  
41    murine model of transient immunoparalysis was performed to assess the virulence traits, and  
42    comparative genomics was used to detect genes involved in virulence.

43    **Results:** Up to  $1.0 \times 10^3$  CFU/g sediment of *N. cyriacigeorgica* and 6 OTUs were retrieved from  
44    the studied UIB. Close phylogenetic relationships were found between environmental and  
45    clinical strains. One environmental isolate (EML446) showed significant infectivity in mice  
46    with pulmonary damages similar to those observed with a highly virulent clinical clone (GUH-

121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180

47 2). The environmental strain harbored several virulence genes implicated in well-described  
48 infectious processes.

49 **Conclusion:** *N. cyriacigeorgica* strains phylogenetically close to clinical strains were isolated  
50 from an UIB. The virulence of one of these isolated strains was as high as the one of the well-  
51 known GUH-2 clinical strain. This finding indicates that ETM-polluted environments such as  
52 UIBs are reservoirs of pathogenic *Nocardia*.

53 **Keywords:** *Nocardia*; Opportunistic pathogen; Environment; Murine model; PAH urban  
54 pollution; *hsp65* metabarcoding

55

181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240

56   **1. Introduction**

57           *Nocardia* are Gram-positive facultative intracellular bacteria responsible for  
58 nocardiosis, a pulmonary infection, similar to pneumonia in 80% of cases, that can be fatal in  
59 patients who are immunocompromised or affected by chronic pulmonary diseases (Rodriguez-  
60 Nava et al., 2019; Heise, 1982). *Nocardia* cells are ubiquitous in the environment but  
61 distribution biases per species are still poorly documented. Nocardiosis are caused by inhalation  
62 of these bacteria from aerosolized soils. *Nocardia* cells are metabolically versatile, and some  
63 species such as *N. cyriacigeorgica* can harbor genes involved in the degradation of petrol-  
64 derivatives (Luo et al., 2014a, 2014b; Quatrini et al., 2008). This property likely explains the  
65 tropism of *Nocardia* cells for polluted environments (Nhi-Cong et al., 2010). *N. cyriacigeorgica*  
66 is also known for its ability to propagate in alveolar macrophages, inducing pulmonary damage.  
67 Some more virulent strains are able to disseminate and reach the brain (Pujic et al., 2015).  
68 Prevalence of *N. cyriacigeorgica* in nocardiosis was estimated to be around 20% in the USA  
69 (Schlaberg et al., 2008), 25% in Spain (Valdezate et al., 2016) and 13% in France (Lebeaux et  
70 al., 2018). The environmental occurrence, persistence and enrichment of *N. cyriacigeorgica*  
71 remain to be defined. Here, the hypothesis of a tropism of *Nocardia* cells, and *N.*  
72 *cyriacigeorgica*, for biotopes found in a city, was tested because of their ability at using petrol-  
73 derivatives as C-sources. Furthermore, we have tested the hypothesis of an on-going evolution  
74 in the virulence traits of these urban *Nocardia* cells. The hypothesis was that city strains should  
75 have a reduced but significant virulence in comparison with clinical isolates, when tested on  
76 mice as an alternative host system.

77           *Nocardia* cells together with other microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa*  
78 and *Aeromonas caviae*, fecal indicators, have recently been shown to be recurrent contaminants  
79 of the urban deposits of a detention basin of a Stormwater Infiltration System (SIS) located in

241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300

80 the Lyon area (France). Emissions of *Nocardia* cells at the outflow of this basin redirecting to  
81 an Urban Infiltration Basin (UIB) were also observed, but the transferred species remained to  
82 be defined (Bernardin-Souibgui et al., 2018). To decrease the environmental impacts of runoff  
83 flooding, SISs have been constructed all over the world to manage runoff transfers and favor  
84 the recharging of local aquifers. Today, more than 5000 SISs are monitored around the world  
85 (Rahmati et al., 2018). Runoff waters getting into SISs are loaded with organic and mineral  
86 particles such as PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), PCBs (Polychlorinated  
87 Biphenyls), heavy metals and microorganisms (Sébastien et al., 2014), which accumulate on  
88 the surface of the infiltration basins to generate the so-called “urban sediments” (Badin et al.,  
89 2011).

90 The presence of pathogenic microorganisms in these sediments constitutes a public  
91 health risk because they can contribute in multiple ways at disseminating hazardous biological  
92 agents either through (i) a transfer into natural water systems such as an aquifer which can be  
93 used for gardening (Marti et al., 2017), (ii) a contamination of animals feeding in these systems  
94 that can come into contact with humans (dogs, cats, rats, birds), or (iii) through an aerosolization  
95 towards environments with environmental characteristics (moisture, pollutants, etc.) that may  
96 also favor their growth (moist urban zones, gas-stations, major road axes, petrochemical  
97 factories, etc.) and the consequent inhalation of these microbial cells by the local populations.  
98 It has to be noted that aerosolized bacterial cells can migrate over large distances as observed  
99 for *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *Klebsiella pneumoniae* (Kaushik et al., 2012).

100 Moreover, the interest of studying UIBs is that, due to their heterogeneity (gradient of  
101 pollutants and moisture), they can mimic various environments that can be found in many other  
102 different locations, such as urban water areas (blue-zones), green areas or puddles after a  
103 rainfall event.



301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360

104           The aims of this study were thus to determine the spatiotemporal distribution biases of  
105 *Nocardia* cells and pathogenic species such as *N. cyriacigeorgica* in an urban SIS, and to  
106 evaluate their hazards for local populations. Epidemiological molecular investigations were  
107 performed to define the phylogenetic relations between SIS *N. cyriacigeorgica* isolates and  
108 clinical strains. The virulence of these isolates was then compared using a double-hit murine  
109 model of transient immunoparalysis, but also through an analysis of genomic contents.

## 110   **2. Materials and Methods**

### 111   *2.1. Stormwater Infiltration System*

112           The studied SIS (named Django-Reinhardt) is part of a long term monitoring site of  
113 OTHU (Field Observatory for Urban Water Management; <http://www.graie.org/othu/>)  
114 (Barraud et al., 2002). It is located in Chassieu, France (eastern part of Lyon). This system has  
115 been operational for approximately 30 years and consists of a detention basin receiving runoff  
116 water from the stormwater network, and discharging its waters into an Urban Infiltration Basin  
117 (UIB), hereafter named DRIB (Django-Reinhardt Infiltration Basin) (Figure 1). The DRIB has  
118 a 1 ha surface and a volume of 61,000 m<sup>3</sup>. The drained surfaces are in a stabilized industrial  
119 area, and the main pollutants found in the accumulated sediments are heavy metals, cyanides,  
120 inks, fats, hydrocarbons and solvents (Winiarski et al., 2015).

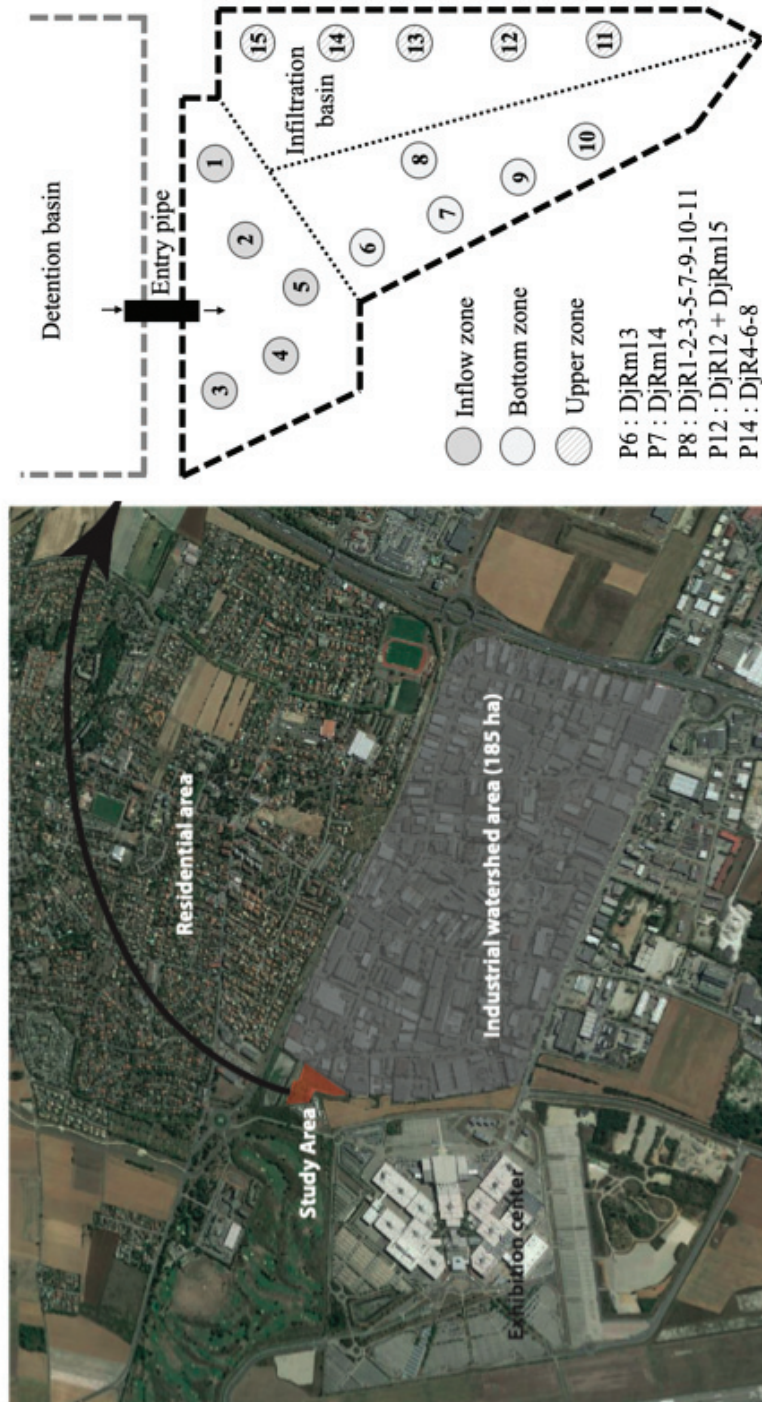
121           The DRIB has been extensively studied. Some of its sediments properties were  
122 characterized according to normalized procedures such as ISO10390 for pH and ISO13320 for  
123 granulometry. Soil moisture was determined by comparative weighing before and after 24 h at  
124 105°C. Additional DRIB data were also extracted from the Gessol report, and indicated a mean  
125 of 2-3.5 mg for each of the 16 well-defined PAHs (WHO)/kg dry sediment (Winiarski et al.,  
126 2015). These values were found equivalent to those of industrial soils, e.g. 3.5 mg/kg according

361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420

127 to (Li et al., 2010), while PAHs in no polluted soils were monitored at 4 to 12 µg/kg (Muntean  
128 et al., 2015).

## 129 2.2. Sampling

130 Urban sediments of the DRIB were sampled during autumn (November), spring (April)  
131 and summer (July) 2015-2016 in three contrasted areas: near the detention basin discharging  
132 pipe (inflow zone), in the middle of the basin (bottom zone), and at the southern end of the  
133 basin (upper zone, five samples per area). These positions match different concentration of  
134 pollutants, distinct hydrological behaviors, soil moisture and vegetation, which might be  
135 explanatory variables for the *Nocardia* cells ecological trends (Figure 1).



462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521

138 **Figure 1.** Aerial image of the Django-Reinhardt infiltration basin (DRIB) and position of the  
139 sampling points in the DRIB and placement of the three different sampling areas (inflow zone,  
140 bottom zone and upper zone). Px: DRIB sample point in which *N. cyriacigeorgica* was isolated  
141 and respective reference code.

### 142 2.3. *hsp65* gene metabarcoding

143 Genomic DNA from environmental samples of the DRIB was extracted using the  
144 FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, France) according to the manufacturer's  
145 instructions. Amplifications were performed on the *hsp65* gene (Table 1) and sequenced by  
146 Biofidal (<https://www.biofidal.com/>) using high-throughput Illumina MiSeq with 2x250 bp,  
147 paired-end chemistry to obtain 20,000 paired reads per sample. Bioinformatics analysis were  
148 performed using the MOTHUR pipeline (Schloss et al., 2009), and according to the frame  
149 previously defined by Marti et al., (2017).

**Table 1.** PCR primers and DNA amplification conditions for *rrs*, *hsp65*, *sodA* and *secA1* genes

Target	Length (bp)	Forward primer (5'-3')		Reverse primer (3'-5')		PCR cycling conditions	Reference
		Primer name	Sequence	Primer name	Sequence		
<i>rrs</i>	569	Noc1	GCTTAACACATGCAAG TCG	Noc2	GAAATCCAGTCTCCCC TG	5 min 94°C; 40x 1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C; 10 min 72°C	Rodriguez- Nava et al. 2006
<i>hsp65</i>	401	TB11	ACCAACGATGGTGTGT CCAT	TB12	CTTGTCGAACCGCATA CCCT	5 min 94°C; 35x 1 min 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C; 10 min 72°C	Telenti et al. 1993
<i>sodA</i>	406	SodV1	CACCA YWSCAAGCAC CA	SodV2	CCTTGACGTTCTGGTA CTG	5 min 94°C; 35x 1 min 94°C, 1 min 52°C, 1 min 72°C; 10 min 72°C	Sánchez- Herrera et al. 2017
<i>secA1</i>	469	SecA1	GTAAAACGACGGCCA GGACAGYGAGTGGAT GGGYCGSGTGACCCG	SecA2	CAGGAAACAGCTATG ACGCGACGATGTAG TCCTTGTC	5 min 95°C; 35x 1 min 95°C, 1 min 60°C, 1 min 72°C; 10 min 72°C	Conville et al. 2006
NG	590	NG1	ACCGACAAGGGGG	NG2	GGTTGTAAACCTCTTT CGA	11 min 94°C; 30x 1 min 94°C, 20 sec 55°C, 1 min 72°C; 10 min 72°C	Laurent et al. 1999

Note: Y=C or T, W=A or T and S=C or G

563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622

155     2.3. *Statistical analyses*

156             All datasets were analyzed with the R software (V.3.1.3) (Verzani et al., 2004). The  
157 distribution of the physical-chemical parameters (PAHs, trace metal elements (Cd, Cu, Hg, Pb  
158 and Zn), granulometry, water content) and amount of *Nocardia* (pathogen vs indigenous) was  
159 represented by a between-class analysis (BCA) allowing a longitudinal analysis. Packages ade4  
160 (Charif et al., 2005), mixOmics and RVAideMemoire (Lê Coa et al., 2011) were used. Trace  
161 metal elements were log transformed because they don't reach a normal distribution. All the  
162 other parameters were normally distributed according to a Shapiro test. The diversity within  
163 each individual sample was estimated using the non-parametric Shannon and Simpson indexes.  
164 Statistical analyses were performed using ANOVA2 and normality of the residues was tested  
165 in order to establish the significance of the groupings. Only p-values lower to 0.05 were  
166 considered as statistically significant. The correlogram was drawn on R using the corplot  
167 package (Friendly et al., 2002).

168     2.4. *Isolation of environmental Nocardia and phylogenetic analyses*

169             Diluted suspensions of the urban sediments from the DRIB were cultured on Bennett  
170 and Middlebrook semi-selective medium, and colonies with morphological features typical of  
171 *Nocardia* (presenting a white and powdery aspect and embedded in the agar) were purified, and  
172 then identified at the species level by sequencing and analysis of the *16S rRNA* gene, according  
173 to Rodriguez-Nava et al., (2006) and following the CLSI guidelines of similarity percentages  
174 greater than or equal to 99.6% (CLSI, 2008). *N. cyriacigeorgica* isolates were obtained from  
175 2013, and 2015-2016 sampling campaigns. The list of isolates is presented in Table 2.

**Table 2.** List of SIS and clinical strains used in this study, and their origin, main features and MLSA phylogroups.

Patient record	Sample date	Nature of sampling	Immunosuppressed	Tropism	Phylogroup MLSA
OFN.4	03.2015	Pus from cutaneous abscess	Yes	Cutaneous	PI
OFN.5*	10.2017	Bronchial aspiration	Yes	Lung	PI
OFN.6	06.2010	Pus from cerebral abscess	Yes	Brain	PI
OFN.7	06.2015	Bronchial aspiration	No	Brain <sup>d</sup>	PI
OFN.13	02.2015	Skin abscess	Yes	Lung <sup>d</sup>	PI
OFN.14	03.2015	Cervical biopsy	Yes	Brain	PI
DjRm.13	11.2015	UIB <i>hsp65</i> metabarcoding	-	Bottom	PI
DjRm.15	11.2015	UIB <i>hsp65</i> metabarcoding	-	Upper	PI
OFN.8	02.2016	Cervical biopsy	NA	Brain	PII
OFN.9	11.2015	Bronchial aspiration	Yes	Lung	PII
OFN.10	11.2015	Bronchial aspiration	Yes	Lung	PII
OFN.11	07.2011	Pus from cutaneous abscess	No	Cutaneous	PII
OFN.12	04.2014	Blood culture	Yes	Brain <sup>d</sup>	PII
OFN.1	02.2013	Blood culture	No	Lung <sup>d</sup>	PIII
OFN.2	03.2016	Pleural puncture	Yes	Lung	PIII
OFN.3	01.2016	Lung biopsy	Yes	Lung	PIII
EML446	04.2013	UIB polluted sediments	-	Bottom	PIII
DjR.1	11.2015	UIB polluted sediments	-	Bottom	PIII
DjR.2	11.2015	UIB polluted sediments	-	Bottom	PIII
DjR.3	11.2015	UIB polluted sediments	-	Bottom	PIII
DjR.4	07.2016	UIB polluted sediments	-	Upper	PIII
DjR.5	11.2015	UIB polluted sediments	-	Bottom	PIII
DjR.6	07.2016	UIB polluted sediments	-	Upper	PIII
DjR.7	11.2015	UIB polluted sediments	-	Bottom	PIII
DjR.8	07.2016	UIB polluted sediments	-	Upper	PIII
DjR.9	07.2016	UIB polluted sediments	-	Bottom	PIII
DjR.10	07.2016	UIB polluted sediments	-	Bottom	PIII
DjR.11	07.2016	UIB polluted sediments	-	Bottom	PIII
DjR.12	04.2016	UIB polluted sediments	-	Upper	PIII



664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704

## 2.5. Phylogenetic analysis

DNA sequences were generated for the DRIB *N. cyriacigeorgica* isolates (n=13). These sequences were compared with those of clinical *N. cyriacigeorgica* (n=14), and of other *Nocardia* reference strains (n=10). The following strains were considered: *N. abscessus* DSM44432<sup>T</sup>, *N. anaemiae* DMS44821<sup>T</sup>, *N. asteroides* ATCC19247<sup>T</sup>, *N. brasiliensis* ATCC19296<sup>T</sup>, *N. cyriacigeorgica* DSM44484<sup>T</sup>, *N. farcinica* IFM10152<sup>T</sup>, *N. nova* DSM44481<sup>T</sup>, *N. otitidiscaviarum* ATCC14629<sup>T</sup> and *N. vinacea* JCM10988<sup>T</sup> and *N. cyriacigeorgica* GUH-2, the reference pathogenic strain isolated from a fatal case of nocardiosis after a renal transplant in the 1970s (Beaman and Maslan, 1978). These reference strains chosen in this study are phylogenetically closely related to *N. cyriacigeorgica* according to Yassin et al., (2001). Clinical *N. cyriacigeorgica* were obtained from OFN (French Observatory of Nocardiosis, <http://ofn.univ-lyon1.fr/>), and originated from French patients affected by nocardiosis (cutaneous, pulmonary, and cerebral infections). By selecting these strains, we obtained a good representation of the main clinical forms of this disease that encompassed the environmental sampling period of this study (2015-2016).

Bacterial DNAs of these strains were extracted by the boiling method using achromopeptidase (10 U.μL<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich). Amplifications of the following genes were performed: *16S rRNA* (*rrs*), *hsp65*, *sodA*, *secA1*. PCR were performed using PuReTaq<sup>TM</sup> Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) in a final volume of 25 μL with 200 ng of DNA. Primers and PCR conditions are listed in Table 1. Size of the PCR fragments were respectively 569 bp for *rrs*, 401 bp for *hsp65*, 406 bp for *sodA* and 469 bp for *secA1*. PCR products were sequenced by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). Multiple alignments were generated by ClustalW using Seaview version 4.4.2 (Gouy et al., 2010). Only for the phylogenetic analysis of *N. cyriacigeorgica* species based on *hsp65*-gene, we added to our sequences dataset i) some

765  
766  
767 206 sequences from the historically known *hsp65*-based genotypes (Schlaberg et al., 2008;  
768  
769 207 McTaggart et al., 2010; Rudramurthy et al., 2015; Xiao et al., 2016) that are available on  
770  
771 208 Genbank, and ii) some sequences coming from our metabarcoding analysis of strains isolated  
772  
773 209 from the DRIB. For MLSA (multilocus sequence analysis), the *rrs-hsp65-sodA-secA1*  
774  
775 210 sequences were concatenated (1845 bp). Phylogenetic relationships were resolved using the  
776  
777 211 maximum-likelihood method through the MEGA software, version 7.0.16 (Kumar et al., 2016).  
778  
779 212 Bootstrapping using 1,000 replicates was performed for each analysis (single locus or multiple  
780  
781 213 ones).  
782  
783  
784

## 785 214 2.6. Inventory of virulence genes among a *SIS N. cyriacigeorgica* isolate

786  
787  
788 215 The EML446 strain was selected to represent the *SIS N. cyriacigeorgica* isolates. It was  
789  
790 216 grown on BHI agar medium (Difco BD), and its genomic DNA was extracted with the standard  
791  
792 217 phenol-chloroform-isoamyl alcohol method (Gilbert et al., 2000). Genome sequencing was  
793  
794 218 performed on a HiSeq2000 Illumina system by GATC (Mulhouse, France). Assemblage and  
795  
796 219 annotation were performed on MicroScope (Vallenet et al., 2017). Contigs are available from  
797  
798 220 the BioProject [PRJNA542857](#) (Vautrin et al., 2019). Comparative analyses were performed  
800  
801 221 against the GUH-2 genome reported by Zoropogui et al., (2013). In addition, genomic analysis  
802  
803 222 was completed with the genomes of *N. farcinica* IFM10152<sup>T</sup> and *Mycobacterium tuberculosis*  
804  
805 223 H37Rv already available on NCBI.  
806  
807  
808

## 809 224 2.7. Virulence tests with a double-hit murine model of transient immunoparalysis

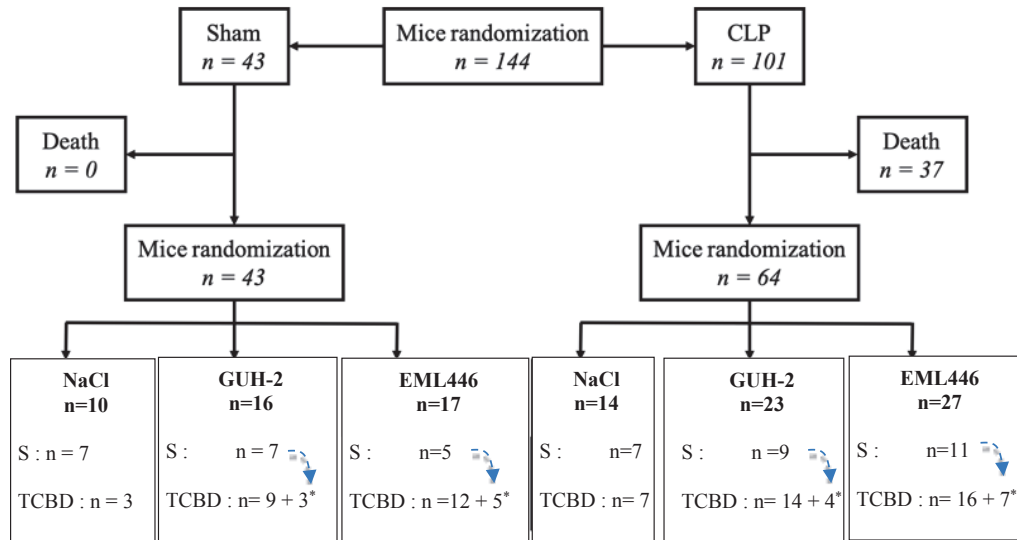
### 810 811 812 225 - 2.7.1. General issues

813  
814  
815 226 All experiments presented below were approved by the Institutional Animal Care and  
816  
817 227 Use Committee at VetAgro Sup (proposal 1403) in accordance with the European Convention  
818  
819 228 for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.  
820  
821  
822

825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884

229           Male mice C57BL/6J (Charles River, L'Arbresle, France) of 7-9 weeks of age (20-25  
230 g) were housed for one week before beginning the experiments at the Veterinary school  
231 (VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France). A 12 hours' dark/light cycle was applied over all  
232 experiments. Immunoparalysis of some mice was induced via a moderate cecal ligation and  
233 puncture (CLP 30%), and *Nocardia* cells (the SIS EML446 or GUH-2 clinical isolate) were  
234 then instilled in the pulmonary airways to test their virulence properties. The CLP procedure  
235 (externalization, puncture, antibiotic treatment and pain control) was performed as described in  
236 Restagno et al., (2016). Controls (Sham-operated mice) underwent laparotomy with exposition  
237 of the cecum but without CLP.

238           The starting mouse population was made of 144 individuals. Animals were randomly  
239 split into six groups: 1) Sham-NaCl mice which received a saline solution; 2) Sham-GUH-2  
240 mice instilled with GUH-2; 3) Sham-EML446 mice instilled with EML446; 4) CLP-NaCl mice  
241 which received a saline solution; 5) CLP-GUH-2 mice instilled with GUH-2; and 6) CLP-  
242 EML446 mice instilled with EML446. Due to the unpredictable exact mortality rate induced by  
243 CLP, more mice were CLP-treated than Sham-treated to reach the right number of CLP  
244 subjects. The aim of the "*Nocardia*-free" groups (*i.e.*, Sham-NaCl and CLP-NaCl) was to  
245 ensure that mortality was not CLP-dependent. The final experimental design is shown in  
246 Figures 2A & B.



**Figure 2A.** Study design describing the experiment made with the immunosuppressed CLP (30%) murine model to compare the virulence of the SIS and clinical *N. cyriacigeorgica* representative strains. Sham = mice that underwent laparotomy with exposition of the cecum but without CLP. CLP = intestinal tract externalization and puncture performed as described in Restagno et al. (2016). S= Survival experiment. TCBD = Time Course Bacterial Detection experiment. n = number of individuals in each group. \* = surviving mice at the end of the ‘S’ experiment retrieved for ‘TCBD’ one at D33 (GUH-2) or D41 (EML446).

Group	Day	Mice number for TCBD
Sham GUH-2	4	5
	10	3
	33	1 + 3*
Sham EML446	4	5
	10	5
	33	2
	41	5 *, a)
CLP GUH-2	4	5
	10	5
	33	4 + 4*
CLP EML446	4	7 <sup>b)</sup>
	10	4
	33	5
	41	7 *, c)

**Figure 2B:** Mice distribution for the Time Course Bacterial Detection experiment (TCBD). \*

= Surviving mice from the end of the Survival experiment retrieved at the end of the TCBD one. a) lungs of two mice will be reserved for histological analysis, b) lungs of one mouse will be reserved for histological analysis. c) lungs of three mice and brains of two mice will be reserved for histological analysis.

Strains GUH-2 and EML446 were cultivated in BHI medium and adjusted to  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL to provide an instillation of  $1.0 \times 10^6$  bacteria in 50  $\mu$ L of physiological saline. To determine this dose of bacteria, considered as the sublethal one, prior studies were performed with three different bacterial concentrations (data not shown).

1005  
1006  
1007 265 - 2.7.2. *Mouse survival monitorings*  
1008  
1009 266 After instillation, the mice were monitored and weighed every day until death or at the  
1010  
1011 267 end of the experiment, *i.e.* 41 days. In agreement with the Remick laboratory report (Nemzek  
1012  
1013 268 et al., 2004), mice were systematically euthanized when they reached the cutoff point, *i.e.* when  
1014  
1015 269 they were found in a moribund state identified by the inability to maintain an upright position  
1016  
1017 270 associated or not with labored breathing and cyanosis. Classical signs of distress, such as  
1018  
1019 271 anorexia and weight loss (> 20%), hunching, prostration, impaired motility, labored breathing,  
1020  
1021 272 ruffled haircoat, and dehydration, were assessed. Mice exhibiting at least four of these criteria  
1022  
1023 273 were euthanized via isoflurane (5%) anesthesia followed by cervical dislocation. Mice  
1024  
1025 274 exhibiting less than four of these criteria were re-inspected each 8 hours. Then, if the conditions  
1026  
1027 275 of the mice worsened, they were euthanized. Surviving mice were used for detection of  
1028  
1029 276 *Nocardia* cells at days 33 and 41. Survival curves (Kaplan–Meier plots) were compared by log  
1030  
1031 277 rank test and performed on Prism8 software. P values < 0.005 were considered statistically  
1032  
1033 278 significant.  
1034  
1035  
1036  
1037  
1038 279 - 2.7.3. *Detection and visualization of Nocardia cells among mouse organs*  
1039  
1040 280 Organ histologic examinations were performed on the dead or euthanized mice. The  
1041  
1042 281 inflammatory response and tissue damages due to *Nocardia* were evaluated at 4, 10, 33 and 41  
1043  
1044 282 days according to distribution of Figure 2B. Small pieces of kidneys, spleen and liver were  
1045  
1046 283 removed and fixed in formalin. For brain analysis and lung, the organs were removed and fixed  
1047  
1048 284 by intratracheal infusion of paraformaldehyde (4%). They were kept in 4% paraformaldehyde  
1049  
1050 285 for at least 36 hours, dehydrated in successive baths with 30, 50 and 70% ethanol, embedded in  
1051  
1052 286 paraffin, cut into 8 µm sections and stained with hematoxylin and eosin (Feldman and Wolfe,  
1053  
1054 287 2014).  
1055  
1056  
1057  
1058  
1059  
1060  
1061  
1062  
1063  
1064



1065  
1066  
1067  
1068  
1069  
1070  
1071  
1072  
1073  
1074  
1075  
1076  
1077  
1078  
1079  
1080  
1081  
1082  
1083  
1084  
1085  
1086  
1087  
1088  
1089  
1090  
1091  
1092  
1093  
1094  
1095  
1096  
1097  
1098  
1099  
1100  
1101  
1102  
1103  
1104  
1105  
1106  
1107  
1108  
1109  
1110  
1111  
1112  
1113  
1114  
1115  
1116  
1117  
1118  
1119  
1120  
1121  
1122  
1123  
1124

288           Crushed organs (lung, kidneys, brain, spleen and liver) diluted in 4.5 mL of a saline  
289 physiological solution, and serially diluted ( $10^{-1}$  to  $10^{-4}$ ) was used to estimate *Nocardia* plate  
290 count numbers. These plate counts were performed on BHI agar medium after a validation of  
291 the bacterial colonies using a *Nocardia*-specific PCR (NG1/NG2 primers (Table 1)). DNA  
292 extracts were produced from 200  $\mu$ L of the above crushed organs using the NucleoSpin® Tissue  
293 kit (Macherey-Nagel, France). The *Nocardia*-specific PCR was then applied on these extracts  
294 to verify the presence of *Nocardia* cells in these organs.

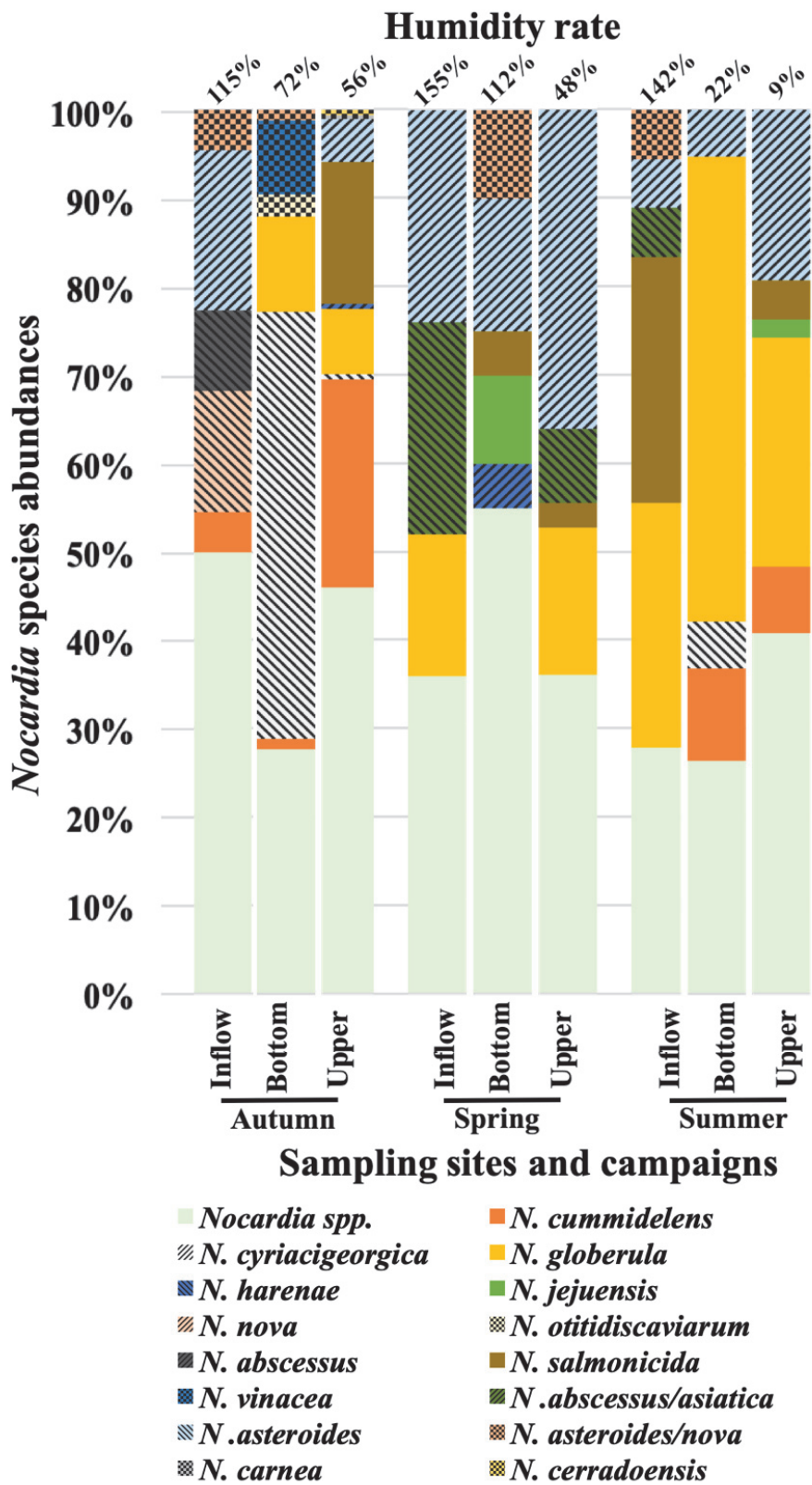
### 295   **3. Results**

#### 296   *3.1. Spatio-temporal variability of Nocardia cells in soils from an infiltration basin*

297   Prior comparing the distribution of *Nocardia* cells between areas of the SIS and sampling  
298 periods, a few parameters were monitored for each sampling point. Soil water content of the  
299 SIS was quite variable between the three sampled areas and campaigns, varying from 9% in the  
300 upper zone in summer to saturation (155%) in the inflow zone in spring (Figure 3). General  
301 trend was a higher moisture, at least 115%, in the inflow zone, and a lower water content, not  
302 higher than 56%, in the upper zone. Granulometry did not exhibit much variability between  
303 samples, with a relative mean sand content of 55-60% and a clay content of 40-45% (data not  
304 shown). Regarding metal trace elements, they have been shown to be constant over the time:  
305 Zn concentration remained around 0.5 mg/L and it was the highest concentration detected when  
306 comparing to other elements that respect the following relationship:  $Cd < Pb < Cu < Zn$  (data  
307 not shown). These pollutants were more abundant in the bottom zone than in the inflow and  
308 upper zones (p-value = 0.0195) (**Figure 4 A**). The PAHs, taken individually, harbored two  
309 behaviors for 12 out of 16. So they were clustered according to the zone (fluoranthene, pyrene,  
310 phenanthrene, benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, hereafter “5 PAHs”) or the period of  
311 sampling (naphthalene, acenaphthene, fluorene, benzo(b)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene,

1125  
1126  
1127 312 benzo(ghi)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, hereafter “7 PAHs”). The 4 remaining PAHs  
1128  
1129 313 (acenaphthylene, anthracene, chrysene and benzo(k)fluoranthene) were not considered in this  
1130  
1131 314 study because they don’t exhibit any variability. The 5 PAHs were significantly more abundant  
1132  
1133  
1134 315 in the inflow zone (p-value = 0.0157), while the 7 PAHs were significantly more abundant  
1135  
1136 316 during the summer (p-value =  $6.97 \times 10^{-6}$ ) (**Figure 4 B & C**).  
1137  
1138  
1139  
1140  
1141  
1142  
1143  
1144  
1145  
1146  
1147  
1148  
1149  
1150  
1151  
1152  
1153  
1154  
1155  
1156  
1157  
1158  
1159  
1160  
1161  
1162  
1163  
1164  
1165  
1166  
1167  
1168  
1169  
1170  
1171  
1172  
1173  
1174  
1175  
1176  
1177  
1178  
1179  
1180  
1181  
1182  
1183  
1184

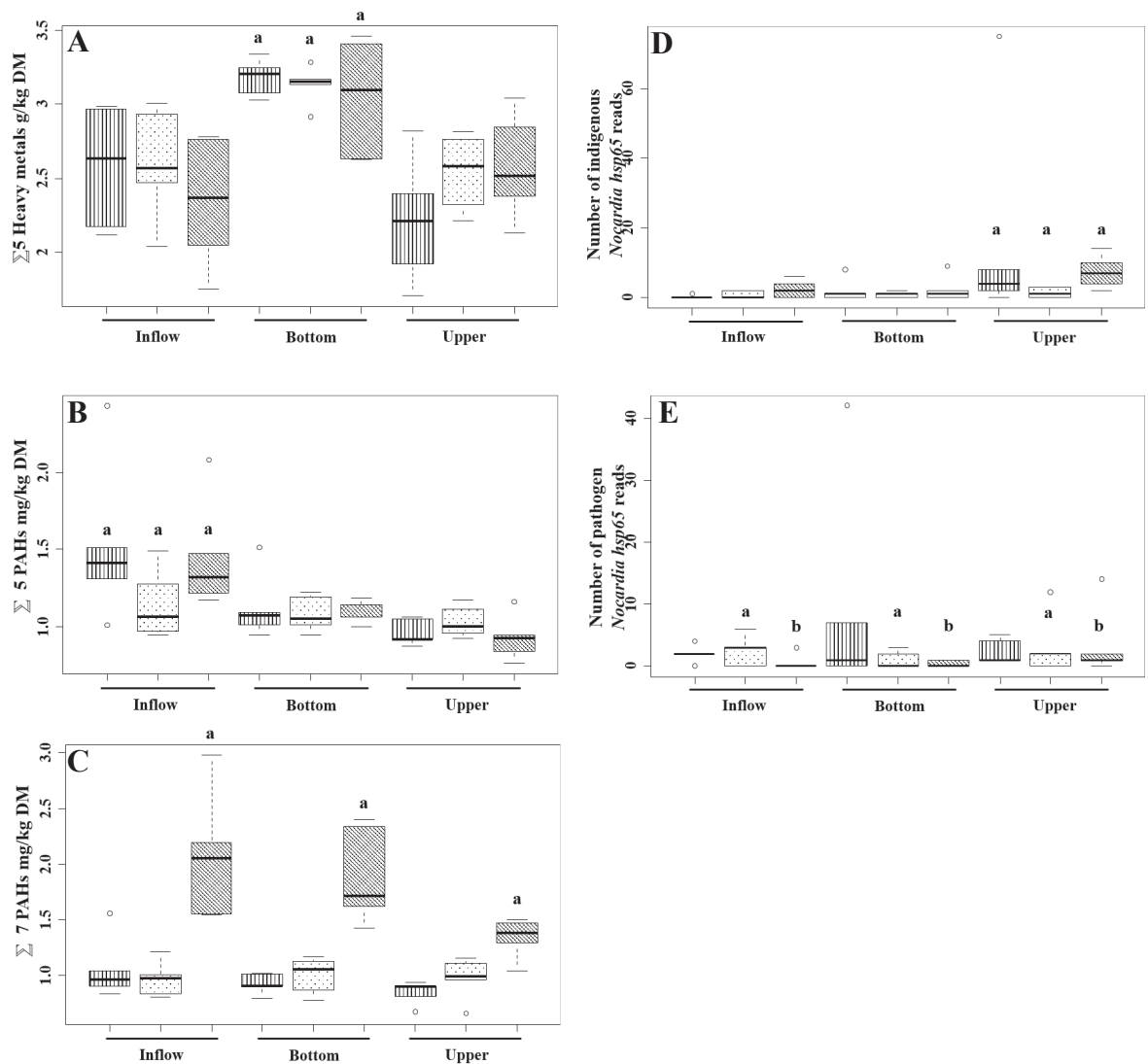
1185  
1186  
1187  
1188  
1189  
1190  
1191  
1192  
1193  
1194  
1195  
1196  
1197  
1198  
1199  
1200  
1201  
1202  
1203  
1204  
1205  
1206  
1207  
1208  
1209  
1210  
1211  
1212  
1213  
1214  
1215  
1216  
1217  
1218  
1219  
1220  
1221  
1222  
1223  
1224  
1225  
1226  
1227  
1228  
1229  
1230  
1231  
1232  
1233  
1234  
1235  
1236  
1237  
1238  
1239  
1240  
1241  
1242  
1243  
1244



317

1245  
1246  
1247  
1248  
1249  
1250  
1251  
1252  
1253  
1254  
1255  
1256  
1257  
1258  
1259  
1260  
1261  
1262  
1263  
1264  
1265  
1266  
1267  
1268  
1269  
1270  
1271  
1272  
1273  
1274  
1275  
1276  
1277  
1278  
1279  
1280  
1281  
1282  
1283  
1284  
1285  
1286  
1287  
1288  
1289  
1290  
1291  
1292  
1293  
1294  
1295  
1296  
1297  
1298  
1299  
1300  
1301  
1302  
1303  
1304

318 **Figure 3.** DNA metabarcoding analysis of *Nocardia* genetic diversity among SIS sediment  
319 samples using the *hsp65* target. A total of 9,017 reads per sample was analyzed. The relative  
320 proportion of the detected *Nocardia* species is present in %. Species representing more than 1%  
321 over the total number of reads are indicated. The classification of most/intermediate/less  
322 frequent pathogens was based on the French epidemiology according to Lebeaux et al., (2018).



323

1305  
1306  
1307  
1308  
1309  
1310  
1311  
1312  
1313  
1314  
1315  
1316  
1317  
1318  
1319  
1320  
1321  
1322  
1323  
1324  
1325  
1326  
1327  
1328  
1329  
1330  
1331  
1332  
1333  
1334  
1335  
1336  
1337  
1338  
1339  
1340  
1341  
1342  
1343  
1344  
1345  
1346  
1347  
1348  
1349  
1350  
1351  
1352  
1353  
1354  
1355  
1356  
1357  
1358  
1359  
1360  
1361  
1362  
1363  
1364

**Figure 4.** Boxplots explicative of the between-class analysis (BCA). **A.** 5 trace element metals: Zn (Zinc), Cu (Copper), Hg (Mercury), Pb (Lead) and Cd (Cadmium). P-value a = 0.0195. **B.** 7 PAHs: naphthalene, acenaphthene, fluorene, benzo(b)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(ghi)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene. P-value a = 6.97x10<sup>-6</sup>. **C.** 5 PAHs: fluoranthene, pyrene, phenanthrene, benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene. P-value a = 0.0157. **D.** Indigenous *Nocardia* species: *N. cummidelens*, *N. globerulea*, *N. harenae*, *N. iowensis*, *N. jejuensis*, *N. pseudovaccinii*, *N. salmonicida*, *N. soli*. P-values a = 0.04055 and b = 0.02963. **E.** Pathogen *Nocardia* species: *N. abscessus*, *N. abscessus/asiatica*, *N. anaemiae*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. carnea*, *N. cerradoensis*, *N. cyriacigeorgica*, *N. ninae*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum*, *N. shimofusensis*, *N. sienata*, *N. vinaceae*. P-value a = 0.0294.

DNA sequencing of the *hsp65* PCR products yielded about 16,000 reads per sediment sample (Table 3). Throughout the three sampling campaigns, the *hsp65* metabarcoding analytical scheme revealed a high diversity through the actinobacteria community (Table 3) but a low variability within each studied zone according to Shannon indices. The *Nocardia* community is also significant and diverse in the DRIB (Figure 3). Between 50-75% of the *hsp65* reads per sampling zone and campaign from the *Nocardia* genus could be allocated to a particular species. The other reads could only be allocated to the *Nocardia* genus, indicating an important diversity that still needs to be resolved. To confirm the accuracy of the Wang text-based Bayesian taxonomic classifications performed with MOTHUR (Wang et al., 2007), representative sequences of the *hsp65* OTUs were analyzed by BLASTn searches using the GenBank database. These searches confirmed all taxonomic inferences and showed that the unclassified sequences did not share enough identities to be clearly allocated to a particular species. Hereafter, only reads allocated to well-defined species were analyzed and compared. A total of fourteen *Nocardia* species (abundance >1%) could be tracked using the *hsp65* metabarcoding approach (Figure 3). Most of these are opportunistic pathogens which also belong to the species

1365  
1366  
1367  
1368  
1369  
1370  
1371  
1372  
1373  
1374  
1375  
1376  
1377  
1378  
1379  
1380  
1381  
1382  
1383  
1384  
1385  
1386  
1387  
1388  
1389  
1390  
1391  
1392  
1393  
1394  
1395  
1396  
1397  
1398  
1399  
1400  
1401  
1402  
1403  
1404  
1405  
1406  
1407  
1408  
1409  
1410  
1411  
1412  
1413  
1414  
1415  
1416  
1417  
1418  
1419  
1420  
1421  
1422  
1423  
1424

349 the most frequently found in French epidemiology. In autumn, the most prevalent *Nocardia*  
350 species in the SIS (inflow, bottom, upper zones) were *N. cyriacigeorgica* and *N. nova* (very  
351 frequent human pathogens) together with *N. asteroides* and *N. cummidelensis*. A segregation  
352 between zones was observed (Figure 3). *N. cyriacigeorgica hsp65* reads were mainly observed  
353 in the driest parts of the DRIB, while *N. nova* reads were mainly in the water saturated samples.  
354 In spring, *N. asteroides hsp65* reads were observed in the three zones, and this species appeared  
355 to be the most prevalent in this environment. Reads from nonpathogenic *N. globerula* and the  
356 complex *N. abscessus/asiatica* (human pathogens) were also obtained in high numbers in the  
357 inflow and upper zones. In summer, most of the detected species were non-pathogenic ones: *N.*  
358 *globetula* showed the highest number of reads over the DRIB, but *N. salmonicida* (a fish  
359 pathogen) reads were higher in the inflow zone (see Figure 3 for a summary of the taxonomic  
360 allocations).

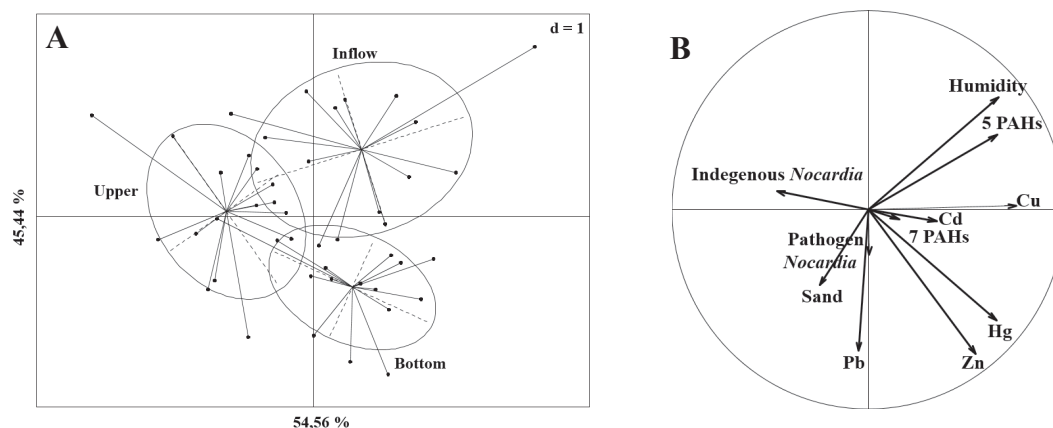
**Table 3.** Diversity and richness indices of the metabarcoding analysis

Zone	Sample	Number of reads	Shannon	Simpson
Inflow	NP1	14,852	6.769454	0.006069
	NP2	11,416	4.599154	0.073997
	NP3	16,725	6.372891	0.014592
	NP4	17,855	6.451997	0.016543
	NP5	16,296	6.147986	0.016220
Bottom	NP6	15,311	5.862727	0.017357
	NP7	12,064	5.402151	0.027591
	NP8	19,138	6.374864	0.019491
	NP9	17,992	6.621081	0.014399
	NP10	19,628	6.360877	0.014470
Upper	NP11	19,100	6.597122	0.019514
	NP12	12,797	6.013042	0.030568
	NP13	17,783	6.879646	0.011622
	NP14	17,387	6.405939	0.027690
	NP15	17,664	6.636493	0.010833

363 Regarding the distribution of OTUs per species, some were repeatedly observed from one

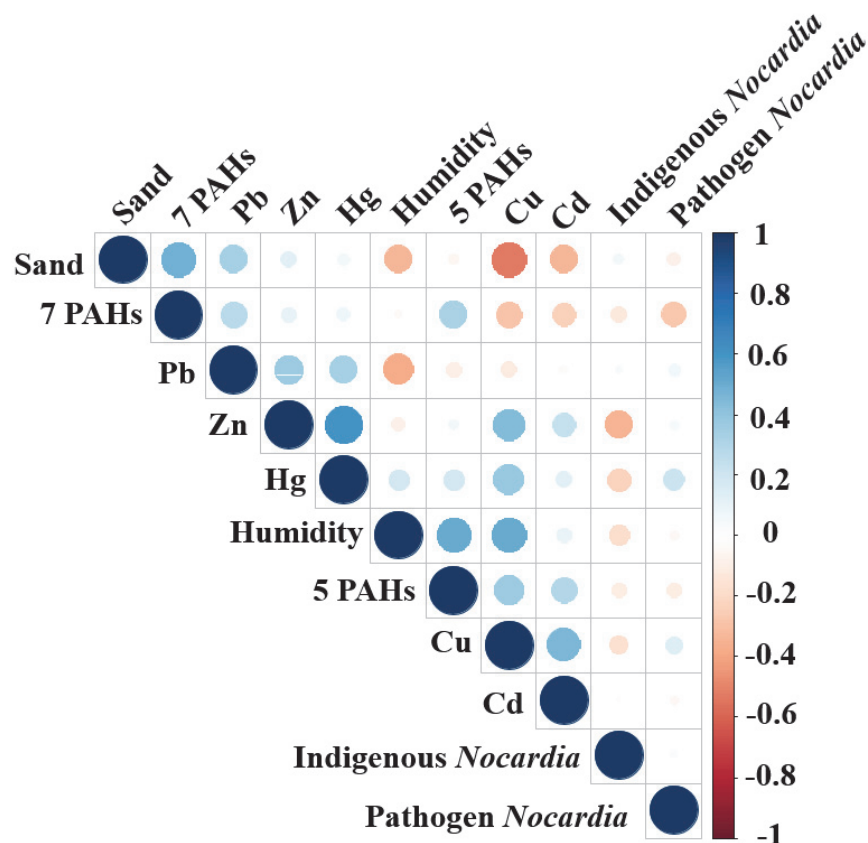
1425  
 1426  
 1427 364 campaign to another. Some OTUs were found in multiple areas of the DRIB. Regarding *N.*  
 1428  
 1429 365 *cyriacigeorgica* which represents one of the species of most health concern for this genus, a  
 1430  
 1431 366 total of 39 sequences was identified, representing 6 OTUs. Most of these sequences (n=36)  
 1432  
 1433  
 1434 367 were recovered from the bottom zone of the DRIB, but one sequence was recovered from the  
 1435  
 1436 368 upper zone. Only one sequence of this species was recovered over two sampling campaigns.  
 1437  
 1438  
 1439 369 Regarding the amount of *Nocardia* species, they were clustered according to their potential  
 1440  
 1441 370 health hazard or not. The pathogen species are significantly less abundant in spring and in  
 1442  
 1443 371 summer than in autumn and different between these two first seasons (p-values = 0.04066 for  
 1444  
 1445 372 the spring and 0.02953 for the summer). The indigenous species, *i.e.* not recognized as  
 1446  
 1447 373 implicated in human nocardiosis, are most present in the upper zone than in the two others (p-  
 1448  
 1449 374 value = 0.0294) (**Figure 4 D & E**).  
 1450  
 1451  
 1452  
 1453 375 When we compare both physical-chemical parameters and *Nocardia* amount, we can see that  
 1454  
 1455 376 there exists a clusterization according to the sampling areas. Humidity and 5 PAHs are  
 1456  
 1457 377 explaining the clusterization in the inflow zone, while only indigenous *Nocardia* species are  
 1458  
 1459 378 explaining the clusterization in the upper zone. In the bottom zone, the explaining parameters  
 1460  
 1461 379 are the pathogen *Nocardia* species, 7 PAHs, the soil granulometry and the heavy metals content  
 1462  
 1463 380 (**Figure 5 A&B**).  
 1464  
 1465  
 1466  
 1467  
 1468  
 1469  
 1470  
 1471  
 1472  
 1473  
 1474  
 1475  
 1476  
 1477  
 1478  
 1479  
 1480  
 1481  
 1482  
 1483  
 1484





**Figure 5 A.** Between-Class Analysis (BCA) performed on physical-chemical parameters and *Nocardia* quantification from sediments of the Django-Reinhardt infiltration basin (DRIB). **B.** Explicative factors of the BCA. 7 PAHs: naphthalene, acenaphthene, fluorene, benzo(b)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(ghi)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene ; 5 PAHs: fluoranthene, pyrene, phenanthrene, benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene; Pathogen *Nocardia* species: *N. abscessus*, *N. abscessus/asiatica*, *N. anaemiae*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. carnea*, *N. cerradoensis*, *N. cyriacigeorgica*, *N. ninae*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum*, *N. shimofusensis*, *N. sienata*, *N. vinaceae* ; Indigenous *Nocardia* species: *N. cummidelensis*, *N. globerula*, *N. harenae*, *N. iowensis*, *N. jejuensis*, *N. pseudovaccinii*, *N. salmonicida*, *N. soli*.

The correlogram highlights the potential correlation between metal trace elements and the amount of indigenous and pathogen *Nocardia* species (**Figure 6**). Indeed, a negative correlation is observed between the presence of zinc, mercury, copper and the indigenous species while there is a positive correlation between mercury, lead, zinc and copper with pathogen species. The humidity is also negatively correlated with the presence of indigenous species.



397

398 **Figure 6.** Correlogram of the physical-chemical parameters and *Nocardia* pathogen and  
 399 indigenous species amount.

400 To support the inferences made by the *hsp65* metabarcoding approach, attempts at isolating *N.*  
 401 *cyriacigeorgica* strains from the DRIB sediment samples were performed. An averaged *N.*  
 402 *cyriacigeorgica* plate count number of  $1.0 \times 10^3$  CFU/g dry sediment was obtained. From these  
 403 platings, some isolates were purified, and twelve were confirmed to be *N. cyriacigeorgica*  
 404 strains (by *rrs* gene and *hsp65* typings) (see below). These strains were named DjR1 to 12  
 405 (2015-2016 isolates). Additional isolate named EML446 was obtained from bottom area

1605  
1606  
1607 406 sediment sample collected in 2013. The DjRm13-15 are sequences identified according to the  
1608  
1609 407 metabarcoding analysis on the sampled sediments of the DRIB (2015-2016). Location of these  
1610  
1611 408 isolates and sequences over the DRIB is indicated on Figure 1. Deeper taxonomic allocations  
1612  
1613 409 of these strains by phylogenetic analysis are shown below.  
1614  
1615

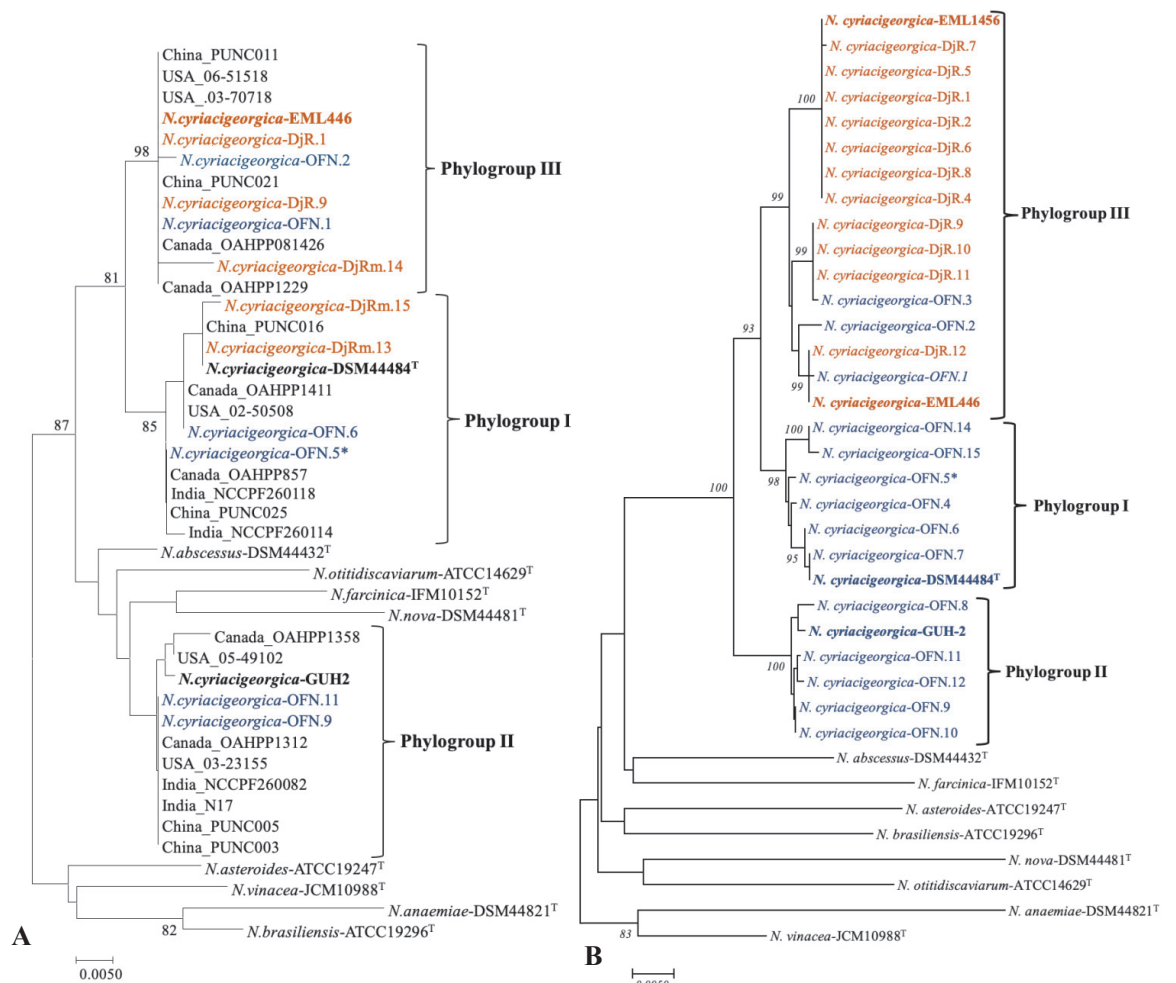
### 1616 1617 410 3.2. Phylogenetic relatedness of SIS and clinical isolates 1618 1619

1620 411 The *hsp65* metabarcoding approach gave a more general view of *Nocardia* diversity  
1621  
1622 412 among a complex SIS isolates community allowing to go until the species (Figure 3) and for  
1623  
1624 413 some cases to resolve the infra-specific allocations as it was the case for *N. cyriacigeorgica*  
1625  
1626 414 species (Figure 7A: DjRm sequences only). However, an OTU detected via metabarcoding  
1627  
1628 415 should to be considered as a complex of genotypes which can encompass several clonal  
1629  
1630 416 complexes. For this reason, infra-specific epidemiological investigations require longer DNA  
1631  
1632 417 sequences per genetic locus, and, often, several loci per genome in order to reduce the incidence  
1633  
1634 418 of horizontal gene transfers on the observed classifications. To go deeper into the evaluation of  
1635  
1636 419 health hazards that can be associated with SIS *N. cyriacigeorgica* isolates, we obtained the  
1637  
1638 420 phylogenetic trees built from individual locus and concatenated genetic loci (*rrs*, *hsp65*, *sodA*,  
1639  
1640 421 *secA1*) (Figure 7). The phylogenetic tree based on *rrs* gene grouped all the clinical and  
1641  
1642 422 environmental *N. cyriacigeorgica* strains into a single phylogroup (data not shown). The  
1643  
1644 423 phylogenetic tree obtained from *hsp65* gene sequences of the analyzed strains in this work  
1645  
1646 424 showed a distribution into three significant phylogroups (PI, PII and PIII) that matched previous  
1647  
1648 425 groups defined by Schlager et al., (2008). Phylogroup I (PI) harbored the *N. cyriacigeorgica*  
1649  
1650 426 type strain *hsp65* sequence, environmental sequences obtained from the metabarcoding analysis  
1651  
1652 427 and French clinical strains, including one belonging to a patient from Lyon, which was a  
1653  
1654 428 resident in the geographic area of the DRIB. Phylogroup II (PII) harbored clinical strains  
1655  
1656 429 including GUH-2. Phylogroup III (PIII) also harbored SIS *N. cyriacigeorgica* isolates and  
1657  
1658  
1659  
1660  
1661  
1662  
1663  
1664

1665  
1666  
1667  
1668  
1669  
1670  
1671  
1672  
1673  
1674  
1675  
1676  
1677  
1678  
1679  
1680  
1681  
1682  
1683  
1684  
1685  
1686  
1687  
1688  
1689  
1690  
1691  
1692  
1693  
1694  
1695  
1696  
1697  
1698  
1699  
1700  
1701  
1702  
1703  
1704  
1705  
1706  
1707  
1708  
1709  
1710  
1711  
1712  
1713  
1714  
1715  
1716  
1717  
1718  
1719  
1720  
1721  
1722  
1723  
1724

430 clinical strains. Bootstrap values were >80 only for PI (85) and PIII (98) (Figure 7a).

431           For *sodA* and *secA1*, the phylogenetic tree structures were in agreement with the one  
432 derived from *hsp65* gene (data not shown). The MLSA phylogenetic tree of concatenated genes  
433 increased the reliability of the groupings (Figure 7B). This tree better resolved the relatedness  
434 of the SIS isolates with the clinical strains. Low infra-specific divergences were observed  
435 within PI (similarity mean = 99.7%, min-max = 99.4-100%) and PII (similarity mean = 99.8%,  
436 min-max = 99.6-100%). In PIII, infra-specific divergences were higher (mean identities =  
437 99.5%, min-max = 99.2%-100%) (Table 4). The MLSA tree showed a clear differentiation of  
438 the SIS genotypes into at least three large clonal complexes, with two complexes grouping most  
439 of the clinical isolates from the French Observatory of Nocardiosis (PI and PII) and PIII  
440 grouping three clinical isolates involved in pulmonary infections and most of our environmental  
441 strains (PIII).



**Figure 7.** Molecular phylogeny of *Nocardia cyriacigeorgica* SIS isolates. **A)** Unrooted phylogenetic tree based on the *hsp65* sequences (401 bp) from USA (Schlaberg et al., 2008), Canada (MacTaggart et al., 2010), India (Rudramurthy et al., 2015) and China (Xiao et al., 2016) isolates, and representative sequences of *N. cyriacigeorgica* sequences from the metabarcoding analysis, and the clinical and SIS strains reported in this study. OFN.5\* corresponds to a patient from Lyon (France). DjR.1, DjR.9 and EML446 corresponding *hsp65* sequences were used to represent the environmental cluster. **B)** Unrooted phylogenetic tree based on the *rrs-hsp65-sodA-secA1* concatenated sequences (1845 bp). The maximum

1785  
1786  
1787 451 likelihood tree was constructed using MEGA software (version 7.0.16) after having aligned the  
1788  
1789 452 sequences with ClustalW. The bootstrap values were calculated from 1,000 replicates, and those  
1790  
1791 453 higher than 80% are given at the corresponding nodes. Clinical strains are colored in blue, and  
1792  
1793  
1794 454 environmental strains are colored in orange.  
1795  
1796  
1797  
1798  
1799  
1800  
1801  
1802  
1803  
1804  
1805  
1806  
1807  
1808  
1809  
1810  
1811  
1812  
1813  
1814  
1815  
1816  
1817  
1818  
1819  
1820  
1821  
1822  
1823  
1824  
1825  
1826  
1827  
1828  
1829  
1830  
1831  
1832  
1833  
1834  
1835  
1836  
1837  
1838  
1839  
1840  
1841  
1842  
1843  
1844

1845  
1846  
1847  
1848  
1849  
1850  
1851  
1852  
1853  
1854  
1855  
1856  
1857  
1858  
1859  
1860  
1861  
1862  
1863  
1864  
1865  
1866  
1867  
1868  
1869  
1870  
1871  
1872  
1873  
1874  
1875  
1876  
1877  
1878  
1879  
1880  
1881  
1882  
1883  
1884  
1885

455 **Table 4.** Identities between *rrs-hsp65-sodA-secA1* sequences of a same phylogroup or between phylogroups  
456

Phylogroups	Similarity	<i>rrs-hsp65-sodA-secA1</i>	<i>rrs</i>	<i>hsp65</i>	<i>sodA</i>	<i>secA1</i>
Phylogroup I	Similarity range (%)	99.4-100	100-100	99.8-100	99.8-100	99.7-100
	Similarity average (%)	99.7	100	99.9	99.9	99.9
Phylogroup II	Similarity range (%)	99.6-100	100-100	99.8-100	99.9-100	99.7-100
	Similarity average (%)	99.8	100	99.9	100	99.9
Phylogroup III	Similarity range (%)	99.2-100	98.8-100	99.9-100	99.9-100	99.4-100
	Similarity average (%)	99.5	99.9	99.9	100	99.7
PI - PII	Similarity range (%)	95.1-99.1	100-100	99.2-99.5	99.4-99.7	99.1-99.4
	Similarity average (%)	98.4	100	99.4	99.5	99.3
PI - PIII	Similarity range (%)	98.5-99.0	99.8-100	99.6-99.8	99.7-99.9	99.2-99.5
	Similarity average (%)	98.8	99.9	99.7	99.7	99.4
PII - PIII	Similarity range (%)	97.8-98.4	98.8-100	99.3-99.5	99.6-99.7	98.8-99.0
	Similarity average (%)	98.1	99.9	99.5	99.7	98.9



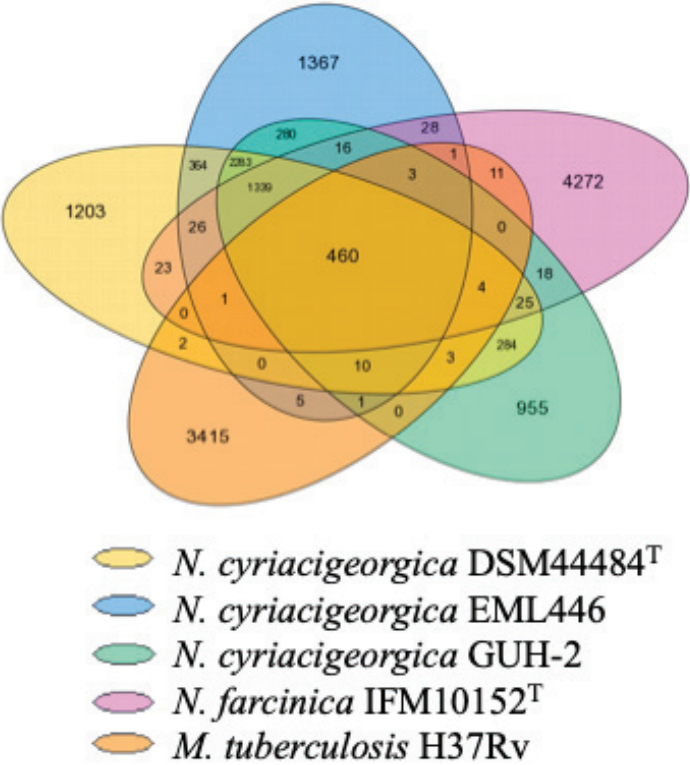
1886  
1887  
1888  
1889  
1890  
1891  
1892  
1893  
1894  
1895  
1896  
1897  
1898  
1899  
1900  
1901  
1902  
1903  
1904  
1905  
1906  
1907  
1908  
1909  
1910  
1911  
1912  
1913  
1914  
1915  
1916  
1917  
1918  
1919  
1920  
1921  
1922  
1923  
1924  
1925  
1926  
1927  
1928  
1929  
1930  
1931  
1932  
1933  
1934  
1935  
1936  
1937  
1938  
1939  
1940  
1941  
1942  
1943  
1944  
1945

458     3.3. EML 446 and GUH-2 genome comparisons

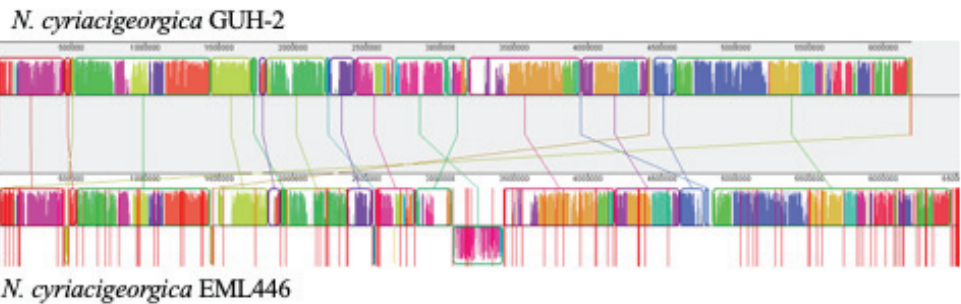
459             The whole genome sequencing (WGS) of *N. cyriacigeorgica* EML446 resulted in the  
460 obtaining of 41 contigs that could be assembled into a circular chromosome of 6,530,670 bp  
461 with a G+C content of 68.21%. This genome encodes 51 tRNA, 3 rRNA and 6,230 CDSs  
462 (coding sequences). Analysis on the MicroScope platform with the Virulome tool highlighted  
463 the presence of 130 CDSs (*i.e.* 2.09% of the CDSs) that can be involved in virulence in EML446  
464 while 108 CDSs involved in virulence were found among GUH-2, the model strain to  
465 investigate virulence in *Nocardia*. Among these CDSs, 96 were found to be in common. A  
466 Venn diagram was drawn to highlight the number of shared CDSs between *N. cyriacigeorgica*  
467 EML446, GUH-2 and DSM44484<sup>T</sup>, and *N. farcinica* IFM10152<sup>T</sup> and *M. tuberculosis* H37Rv  
468 (Figure 8a). The EML446 genome shared 4,392 CDSs with GUH-2 and 4,883 with  
469 DSM44484<sup>T</sup>. GUH-2 and DSM44484<sup>T</sup> shared 4,408 CDSs, and the number of shared CDSs  
470 between any *N. cyriacigeorgica* strain and *N. farcinica* IFM10152<sup>T</sup> or *M. tuberculosis* H37Rv  
471 was lower. On the other hand, the MAUVE analysis highlights a decrease in CDSs content in  
472 the region of genomic plasticity (RGP) between the two genomes *N. cyriacigeorgica* EML446  
473 and GUH-2 (Figure 8b). Comparison of 11 gene families between these genomes did not show  
474 many differences except for polyketide synthase (27 compared to 7 for *Nocardia*), lipoproteins  
475 (62 compared to 7-16) and PE\_PGRS (62 compared to 0-1). Only the NRPS CDSs were lower  
476 for *Mycobacterium*, having 3 compared to 14-17 for *Nocardia* (Table 5). According to these  
477 analyses, EML446 was considered as virulent as the *N. cyriacigeorgica* clinical isolates.

1946  
1947  
1948  
1949  
1950  
1951  
1952  
1953  
1954  
1955  
1956  
1957  
1958  
1959  
1960  
1961  
1962  
1963  
1964  
1965  
1966  
1967  
1968  
1969  
1970  
1971  
1972  
1973  
1974  
1975  
1976  
1977  
1978  
1979  
1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990  
1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005

**a**



**b**



**Figure 8.** Comparison of *N. cyriacigeorgica* EML446 genome with other actinomycetal reference genomes. (a) Venn Diagram representing the number of shared CDSs between whole genomes of *Nocardia cyriacigeorgica* DSM44484<sup>T</sup>, *N. cyriacigeorgica* EML446, *N.*

2006	
2007	
2008	482 <i>cyriacigeorgica</i> GUH-2, <i>N. farcinica</i> IFM10152 <sup>T</sup> and <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv. (b)
2009	
2010	483 MAUVE comparison between EML446 and GUH-2 genomes showing the position of RGPs
2011	
2012	484 (regions of genomic plasticity).
2013	
2014	
2015	
2016	
2017	
2018	
2019	
2020	
2021	
2022	
2023	
2024	
2025	
2026	
2027	
2028	
2029	
2030	
2031	
2032	
2033	
2034	
2035	
2036	
2037	
2038	
2039	
2040	
2041	
2042	
2043	
2044	
2045	
2046	
2047	
2048	
2049	
2050	
2051	
2052	
2053	
2054	
2055	
2056	
2057	
2058	
2059	
2060	
2061	
2062	
2063	
2064	
2065	

**Table 5.** Number of virulence CDSs per functional categories shared between *N. cyriacigeorgica* GUH-2, EML446 and two other pathogenic species *N. farcinica* IFM10152<sup>T</sup> and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv:

Virulence CDSs	<i>N. cyriacigeorgica</i> EML446	<i>N. cyriacigeorgica</i> GUH-2	<i>N. farcinica</i> IFM10152 <sup>T</sup>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
PKS (polyketide synthase)	7	7	7	27
NRPS (nonribosomal peptides synthetases)	17	17	14	3
Lipoproteins (Lpps)	16	17	7	62
Hemolysin	2	2	2	2
Esterases	18	17	24	15
PE_PGRS (proline-glutamic acid polymorphic guanine-cytosine-rich sequence)	1	1	0	62
<i>sod</i> (superoxide dismutase)	2	2	2	2
<i>mce</i> (mammalian cell entry)	6	6	7	4
<i>cat</i> (catalase)	3	3	3	1
<i>narBGHJK</i> (nitrate reductase)	6	6	5	6
<i>nirBD</i> (nitrite reductase)	2	2	2	2

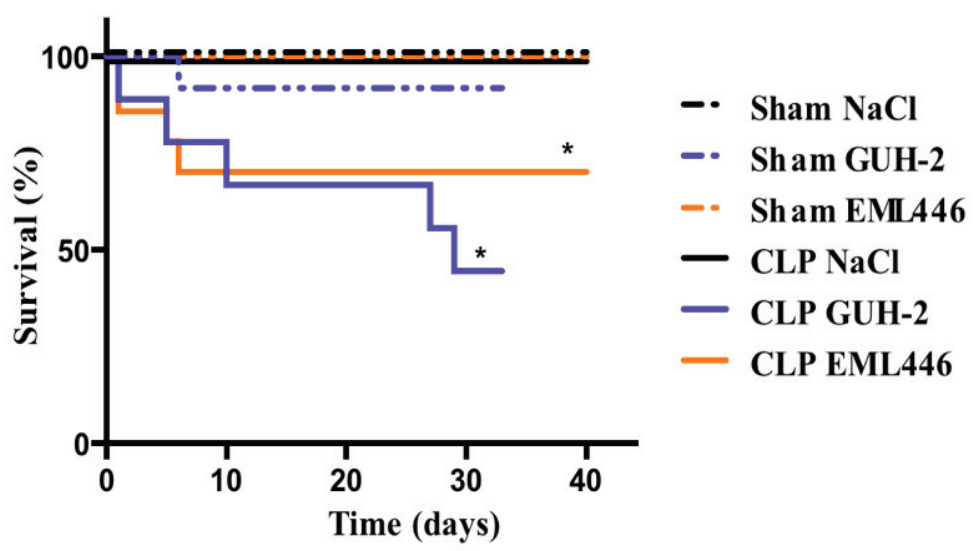
Note: number of genes were found by keyword search tool on the MicroScope platform (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/>). Virulence genes were selected according to [Zoropogui et al., \(2013\)](#).

2107  
2108  
2109  
2110  
2111  
2112  
2113  
2114  
2115  
2116  
2117  
2118  
2119  
2120  
2121  
2122  
2123  
2124  
2125  
2126  
2127  
2128  
2129  
2130  
2131  
2132  
2133  
2134  
2135  
2136  
2137  
2138  
2139  
2140  
2141  
2142  
2143  
2144  
2145  
2146  
2147  
2148  
2149  
2150  
2151  
2152  
2153  
2154  
2155  
2156  
2157  
2158  
2159  
2160  
2161  
2162  
2163  
2164  
2165  
2166

492 3.4. Physiopathology of *N. cyriacigeorgica* in a murine model of transient immunoparalysis

493 In the present study, 37% of the CLP-operated mice died prior to the instillation step  
494 (37/101) in accordance with the model of septic immunoparalysis established by Restagno et  
495 al., (2016). Five days after the first hit, Sham and CLP-operated mice were randomized as  
496 described in Figure 2.

497 The survival results showed a survival rate of 100% after 41 days for Sham-NaCl and  
498 CLP-NaCl groups. For mice intratracheally instilled by a load of *Nocardia* at  $1.0 \times 10^6$   
499 CFU/mouse, Sham-EML446 showed the same survival rate (Figure 9). In the Sham-GUH-2  
500 group, only one mouse died at D6 (survival rate = 86% (6/7 mice)). For both the CLP-GUH-2  
501 and CLP-EML446 groups, during the first 10 days following intratracheal bacterial challenges,  
502 the survival rates were similar: CLP-GUH-2, survival 67% (6/9 mice) and CLP-EML446,  
503 survival 64% (7/11 mice). A second episode of mortality occurred at 30 days for CLP-GUH-2,  
504 decreasing the survival rate at 44% (4/9 mice).



505

2167  
2168  
2169  
2170  
2171  
2172  
2173  
2174  
2175  
2176  
2177  
2178  
2179  
2180  
2181  
2182  
2183  
2184  
2185  
2186  
2187  
2188  
2189  
2190  
2191  
2192  
2193  
2194  
2195  
2196  
2197  
2198  
2199  
2200  
2201  
2202  
2203  
2204  
2205  
2206  
2207  
2208  
2209  
2210  
2211  
2212  
2213  
2214  
2215  
2216  
2217  
2218  
2219  
2220  
2221  
2222  
2223  
2224  
2225  
2226

**Figure 9.** Survival rate after *N. cyriacigeorgica* cells instillations of Sham and CLP mice. Five days post-CLP (*i.e.* D0), mice were challenged with an intratracheal administration of *Nocardia* GUH-2 or EML446 at  $1.0 \times 10^6$  CFU/mouse. Either NaCl (physiological saline solution) (Sham n=7, CLP n=7), GUH-2 (Sham n=7, CLP n=9) or EML446 (Sham n=5, CLP n=11) were instilled. Results are expressed as Kaplan-Meier survival curves. \*  $p < 0.005$  was considered statistically significant compared to the respective control groups.

The TCBD experiment showed that in the Sham-operated group, soon after intratracheal instillation, the lung was the primary infection site of *Nocardia*, but other organs were also affected. At D4, 4/5 Sham-GUH-2 mice presented *Nocardia* in the lungs; in two of them, *Nocardia* was detected in all the studied organs (Figure 10). Only in one mouse, *Nocardia* could not be detected. At D10 and D33, the number of organs positive for *Nocardia* decreased except in the lungs (2/3 mice at D10 and 3/4 mice at D33) and kidneys (1/3 at D10 and 3/4 at D33). For the Sham-EML446 mice, the occurrence rate and dissemination were lower than for the Sham-GUH-2 mice. At D4, *Nocardia* was found in the lungs of 3/5 mice, but the incidence in other organs was lower (1/5) and even null in the brain and spleen. At D10, only 1/5 mice presented *Nocardia* in each organ, and nothing was detected at D33. However, *Nocardia* was found in all organs of one mouse at D41.

		Lungs	Kidneys	Brain	Spleen	Liver
Sham GUH-2	4 days	4/5	2/5	2/5	2/5	2/5
	10 days	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	33 days	3/4	3/4	1/4	2/4	0/4
Sham EML446	4 days	3/5	1/5	0/5	0/5	1/5
	10 days	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
	33 days	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	41 days	1/3 <sup>H n=2</sup>	1/5	1/5	1/5	1/5
CLP GUH-2	4 days	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5
	10 days	5/5	3/5	4/5	4/5	3/5
	33 days	7/8	4/8	4/8	3/8	0/8
CLP EML446	4 days	6/6 <sup>H n=1</sup>	2/7	0/7	0/7	0/7
	10 days	4/4	4/4	3/4	3/4	3/4
	33 days	2/5	3/5	3/5	2/5	3/5
	41 days	4/4 <sup>H n=3</sup>	7/7	4/5 <sup>H n=2</sup>	7/7	6/7

GUH-2	EML446
0 - 19 %	0 - 19 %
20 - 39 %	20 - 39 %
40 - 59 %	40 - 59 %
60 - 79 %	60 - 79 %
80 - 100 %	80 - 100 %

**Figure 10.** Heatmap representing rates of contaminated mice by *N. cyriacigeorgica* and detected with specific *Nocardia*-genus PCR. Mice were sacrificed 4, 10 and 33 days after instillation for the GUH-2 strain and until 41 days for the EML446 strain. Lungs, brain, kidneys, spleen and liver were sampled for *Nocardia* detection. Clinical strain GUH-2 is colored in blue, and environmental EML446 is colored in orange. The deeper is the color, the more contaminated are the mice. The heatmap only reveals the presence or absence of *Nocardia* but is not quantitative. <sup>H</sup> some organs were used for histological analysis and were not available for bacterial detection since it is not technically possible to do both. <sup>n=x</sup> corresponds to the number of mice reserved for histological analysis.

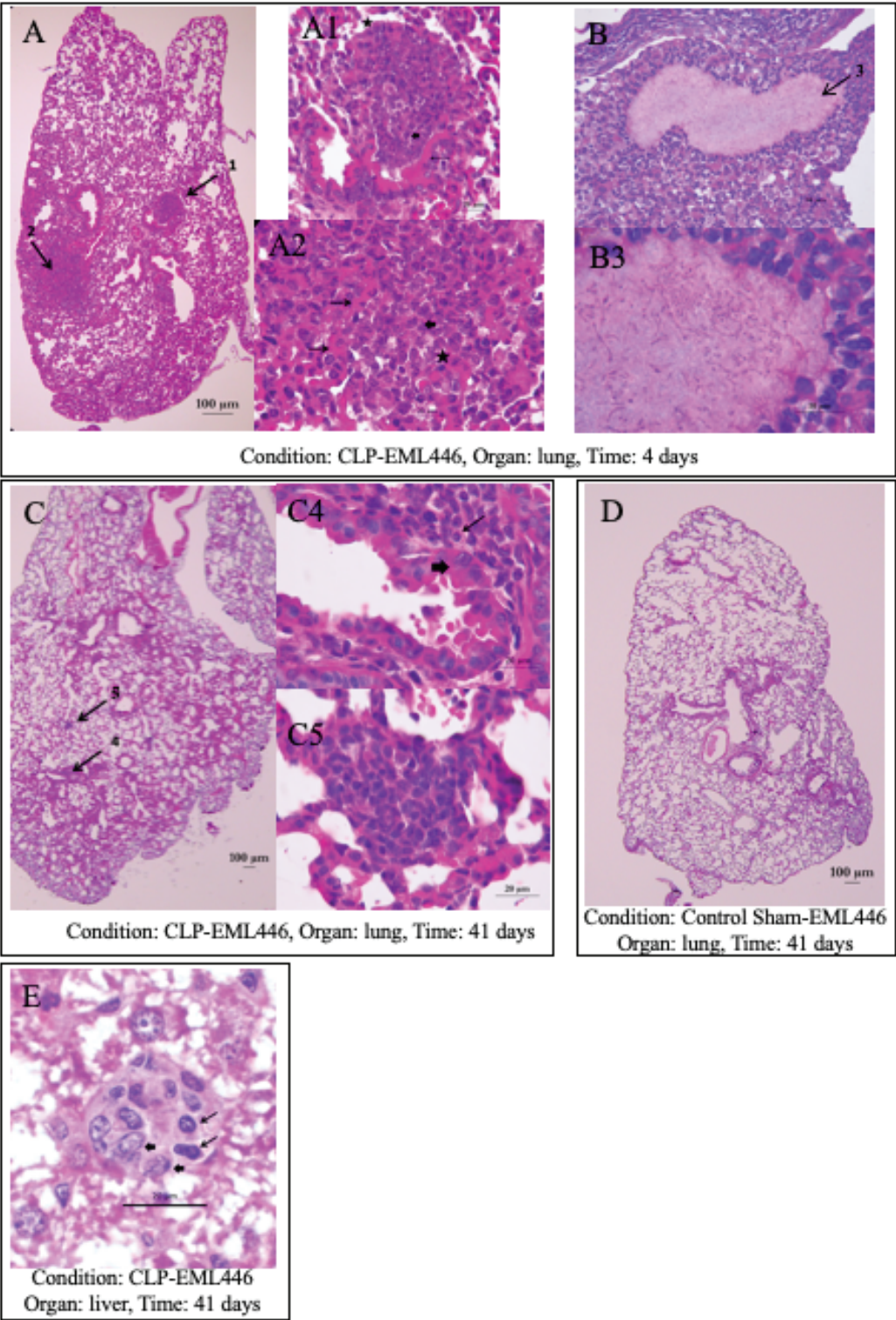
In the CLP-operated group, at D4, the presence of *Nocardia* was observed in all of the inspected lungs for both strains (5/5 for CLP-GUH-2 and 6/6 for CLP-EML446), but it was



2287  
2288  
2289 535 almost missing in the other organs (only in 3/5 CLP-GUH-2 and 2/7 CLP-EML446 in the  
2290  
2291 536 kidneys). At D10, 100% of the inspected lungs were still positive for *Nocardia*, and all the other  
2292  
2293 537 organs became progressively positive: 3/5 (CLP-GUH-2) and 4/4 (CLP-EML446) positive in  
2294  
2295 538 the kidneys, 4/5 (CLP-GUH-2) and 3/4 (CLP-EML446) positive in the brains and spleens, 3/5  
2296  
2297 539 (CLP-GUH-2) and 3/4 (CLP-EML446) positive in the livers. At D33, the presence of *Nocardia*  
2298  
2299 540 in the lungs remained especially high for CLP-GUH-2 mice (7/8) but relatively low for CLP-  
2300  
2301 541 EML446 mice (2/5). Dissemination in other organs was almost similar for both strains  
2302  
2303 542 excepting for the liver. At D41, almost all the organs of CLP-EML446 mice were positive at  
2304  
2305 543 high rates (Figure 10). As expected, no NaCl-operated mice (controls) showed *Nocardia* cells  
2306  
2307 544 in their organs.  
2308  
2309  
2310

2311 545 In the lungs of CLP-EML446 mice (1/1), histological signs of pneumonia similar to  
2312  
2313 546 nocardiosis were clearly observed, as histologic pictures showed multiple cavity lesions at D4  
2314  
2315 547 (Figure 11A & B). A strong mononuclear infiltrate in the periphery of the microabscesses  
2316  
2317 548 among the collagen fibers was also observed (Figure 11A1, A2 & B3). The presence of  
2318  
2319 549 numerous filamentous bacteria in the caseous necrosis area suggests that these granulomatous  
2320  
2321 550 lesions were infectious and that the mice developed nocardiosis (Figure 11B). At D41, 1/3 CLP-  
2322  
2323 551 EML446 mice exhibited mild pneumonia (Figure 11C). Nothing was observed at D41 in Sham-  
2324  
2325 552 EML446 mice (0/2) (Figure 11D). As expected, no histological lesions in any organ were  
2326  
2327 553 observed for Sham-NaCl (n=2 at day 41) or CLP-NaCl (n=2-3 at D4, D10, D33 and n=6 at  
2328  
2329 554 D41) mice. No lesions were found in the brains of CLP-EML446 mice at D41 (n=2). No specific  
2330  
2331 555 nocardiosis lesions were found in other organs (kidney, spleen, liver) at D4, D10, D33 of either  
2332  
2333 556 Sham-EML446 (n=2/organ) or CLP-EML446 (n=2/organ) mice. At D41, no specific  
2334  
2335 557 nocardiosis lesions were found in kidney, spleen, liver of Sham-EML446 (n=5/organ) mice, but  
2336  
2337 558 small granulomas were observed in the livers of 5 CLP-EML446 (n=7/organ) mice (Figure  
2338  
2339 559 11E).  
2340  
2341  
2342  
2343  
2344  
2345  
2346

2347  
2348  
2349  
2350  
2351  
2352  
2353  
2354  
2355  
2356  
2357  
2358  
2359  
2360  
2361  
2362  
2363  
2364  
2365  
2366  
2367  
2368  
2369  
2370  
2371  
2372  
2373  
2374  
2375  
2376  
2377  
2378  
2379  
2380  
2381  
2382  
2383  
2384  
2385  
2386  
2387  
2388  
2389  
2390  
2391  
2392  
2393  
2394  
2395  
2396  
2397  
2398  
2399  
2400  
2401  
2402  
2403  
2404  
2405  
2406



560

2407  
2408  
2409  
2410  
2411  
2412  
2413  
2414  
2415  
2416  
2417  
2418  
2419  
2420  
2421  
2422  
2423  
2424  
2425  
2426  
2427  
2428  
2429  
2430  
2431  
2432  
2433  
2434  
2435  
2436  
2437  
2438  
2439  
2440  
2441  
2442  
2443  
2444  
2445  
2446  
2447  
2448  
2449  
2450  
2451  
2452  
2453  
2454  
2455  
2456  
2457  
2458  
2459  
2460  
2461  
2462  
2463  
2464  
2465  
2466

**Figure 11.** Histological lung and liver sections of CLP-EML446 mouse at days 4 and 41 after intratracheal instillation. **A, B: CLP-EML446 mouse lung at day 4.** Light micrographs of mouse lung section with evidence of granulomatous process characterized by both inflammatory response (**A**) and necrosis usually present in nocardiosis (**B**). **A:** Two early pyogranulomas disseminated in the pulmonary parenchyma (arrows). Original magnification: obj. 4 X, lungs, postcaval lobe. **A1:** enlargement of the pyogranulomas (arrow 1). Multiple degenerated neutrophilic polymorphonuclear cells into a lung alveolus lumen admixed with few macrophages. Some inflammatory cells overflow in the lumen of a bronchus. Thin arrow: bronchus epithelium. Large arrow: neutrophilic polymorphonuclear cells. Star: macrophages. Original magnification: obj. 40 X. **A2:** enlargement of the pyogranulomas (arrow 2). Multiple degenerated neutrophilic polymorphonuclear cells into a lung alveolus lumen admixed with few macrophages. Thin arrows: alveolar wall. Large arrow: neutrophilic polymorphonuclear cells. Star: macrophages. original magnification: obj. 40 X. **B:** The lungs showed cavitory lesions constituted by central necrotic material surrounded by some polymorphonuclear and numerous macrophages. Macrophage alveolitis and interstitial lymphocytic infiltration are also observed. Light micrographs; hematoxylin–eosin staining; original magnification: obj. 40 X. **B3:** High power magnification showing histologic sections of the lesion characterized by caseous necrotic central area with filamentous bacteria inside. Light micrographs; hematoxylin–eosin staining; original magnification: obj. 100 X. **C: CLP-EML446 mouse lung at day 41:** **C:** At day 41, some lymphocyte aggregates are present in the interstitium (arrows). Original magnification: obj. 4 X, lungs, postcaval lobe. **C4:** enlargement of the aggregate (arrow 4). Some small lymphocytes (thin arrow) infiltrate the interstitium beneath the bronchial epithelium (large arrow). Original magnification: obj. 100 X. **C5:** enlargement of the aggregate (arrow 5). Some small lymphocytes infiltrate the interstitium of the interalveolar wall. Original magnification: obj. 100 X. **D: Sham EML446 mouse lung at day 41.** no lesions. Original

2467  
2468  
2469 586 magnification obj. 4 X, lungs, postcaval lobe. **E: CLP-EML446 mouse liver at day 41.** Mature  
2470  
2471 587 granuloma disseminated at random into liver lobules. Thin arrows: lymphocytes. Large arrows:  
2472  
2473 588 macrophages. Original magnification obj. 100 X.  
2474  
2475

#### 2476 2477 589 **4. Discussion** 2478

2479  
2480 590 The dissemination of hazardous biological agents in cities, outside hospital settings, remain  
2481  
2482 591 largely under explored. Urban soils and waters can offer shelters for some pathogenic micro-  
2483  
2484 592 organisms such as the opportunistic ones. With their increasing contact with human  
2485  
2486 593 populations, these pathogens might be undergoing selective processes that will make them  
2487  
2488 594 better fit for a colonization of the human host. Furthermore, urban chemical pollutants seem to  
2489  
2490 595 generate a “dangerous liaison” with these micro-organisms as demonstrated by (Cui et al.,  
2491  
2492 596 2017) who found the presence of 16 bacterial genera harboring pathogenic species such as  
2493  
2494 597 *Aeromonas* and *Mycobacterium* in polluted lakes in an industrial area in China. Furthermore,  
2495  
2496 598 (Chulan et al., 2019) showed a relation between concentrations of chemical pollutants and  
2497  
2498 599 airborne pathogenic bacteria in air samples. Regarding *Nocardia*, also, some authors have  
2499  
2500 600 already described a potential relationship between organic pollutants and presence of *Nocardia*.  
2501  
2502 601 As explained by Arrache et al., (2018) this relationship could explain the infective source  
2503  
2504 602 associated to a case of a cerebral nocardiosis of an immunocompetent individual exposed to the  
2505  
2506 603 inhalation during a long period of time of dusts rich in hydrocarbons in a refinery which  
2507  
2508 604 probably hosted the *Nocardia* species responsible of his pathology.  
2509  
2510

2511  
2512  
2513 605 *Nocardia* are known to be widely spread among outdoor environments but several  
2514  
2515 606 species represent a public health concern. This genus includes opportunistic pathogens that  
2516  
2517 607 cause infection primarily following inhalation in the lungs (Garcia-Bellmunt et al., 2012;  
2518  
2519 608 Steinbrink et al., 2018). These species can cause pulmonary nocardiosis in  
2520  
2521 609 immunocompromised individuals associated with high-dose corticosteroids treatments  
2522  
2523  
2524  
2525  
2526

2527  
 2528  
 2529 610 (Eshraghi et al., 2014; Steinbrink et al., 2018). Non-immunocompromised patients like cigarette  
 2530  
 2531 611 smokers, or those affected by bronchiectasis and acute bronchitis, and other chronic  
 2532  
 2533 612 pulmonary diseases, are also at risk of pulmonary nocardiosis. These clinical pictures affect  
 2534  
 2535 613 about 60 million people around the world, according to the WHO, and are often related to high  
 2536  
 2537 614 atmospheric pollution including high content in aerosolized dusts. These dusts can be generated  
 2538  
 2539 615 by several urban components such as motor engines, chemical industries, garbage incinerators,  
 2540  
 2541 616 stored garbage on sidewalks, plant and animal detritus, etc. They are accumulating on urban  
 2542  
 2543 617 surfaces and washed away with the runoff waters during rain events or aerosolized. Polluted  
 2544  
 2545 618 urban runoffs are nowadays transferred either to wastewater treatment plants (WWTP), SIS, or  
 2546  
 2547 619 natural waterways. These washed urban sediments can thus create novel growth conditions for  
 2548  
 2549 620 opportunistic human pathogens that are known to be well-adapted for a growth on chemical  
 2550  
 2551 621 pollutants. Results obtained in this study supported this hypothesis as high numbers of *N.*  
 2552  
 2553 622 *cyriacigeorgica* cells were observed among SIS sediments, and these cells were allocated to a  
 2554  
 2555 623 phylogroup harboring confirmed clinical strains that had been involved in lung infections.  
 2556  
 2557 624 Other pathogenic *Nocardia* species such as *N. abscessus* (associated mainly with cerebral and  
 2558  
 2559 625 pulmonary infections), *N. nova* (related with pulmonary and cutaneous cases), and *N.*  
 2560  
 2561 626 *otitidiscaviarum* (causing mainly cerebral infections and multidrug resistant) were also  
 2562  
 2563 627 identified among SIS through the use of a novel metabarcoding approach based on the *hsp65*  
 2564  
 2565 628 gene target. These species can thus also be disseminated through SIS and aerosolized deposits.  
 2566  
 2567  
 2568  
 2569  
 2570 629 Sediments analyzed from the DRIB showed variable water contents, high hydrocarbon  
 2571  
 2572 630 pollution and variable plant cover. The main pollution recorded in this urban environment is  
 2573  
 2574 631 due to PAHs. The high amount of PAHs has a pyrogenic origin according to the  
 2575  
 2576 632 phenanthrene/anthracene <10 and fluoranthene/pyrene >1 ratio for all the samples in  
 2577  
 2578 633 accordance with Budzinski et al., (1995) and Yunker et al., (2002). This pyrogenic origin could  
 2579  
 2580 634 be explained by the industrial activity in this area and the engine gasoline combustion. No  
 2581  
 2582  
 2583  
 2584  
 2585  
 2586



2587  
 2588  
 2589 635 petrogenic origin could be identified in this study, contrary to Marti et al., (2017) that reported  
 2590  
 2591 636 a petrogenic origin for most of the PAHs in the detention basin upstream the infiltration basin,  
 2592  
 2593 637 indicating a good performance in removing oils from water and avoiding the plugging of the  
 2594  
 2595 638 infiltration basin. Nadudvari & Fabianska (2015) reported a pyrogenic origin in sediments in a  
 2596  
 2597 639 river in Poland arising from runoff water and city waste combustion. The same phenomenon  
 2598  
 2599 640 was first described by Radke & Welte (1983) in oil wells in Canada. Five of the detected PAHs  
 2600  
 2601 641 (phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene) were already  
 2602  
 2603 642 reported by Winiarski et al., 2015) in the same DRIB as being specially more abundant for the  
 2604  
 2605 643 inflow zone which is confirmed by our study. On the other side, we observed a group of 7 PAHs  
 2606  
 2607 644 (naphthalene, acenaphthene, fluorene, benzo(b)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene,  
 2608  
 2609 645 benzo(ghi)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene) that are more abundant in summer regardless the  
 2610  
 2611 646 measured zone which agrees with the study of Belles et al., (2016) also in the same studied  
 2612  
 2613 647 system. Regarding the correlation between pollutants and abundancy of *Nocardia*, this high  
 2614  
 2615 648 amount of PAHs seems to inhibit the development of *Nocardia* species, while metal trace  
 2616  
 2617 649 elements are an explicative factor of pathogen species presence in the bottom zone of this  
 2618  
 2619 650 infiltration basin. Regarding the influence of PAHs in pathogenic *Nocardia*, the upper zone,  
 2620  
 2621 651 considered as the less contaminated zone, was the one with lowest counts in *N. cyriacigeorgica*.  
 2622  
 2623  
 2624  
 2625  
 2626  
 2627  
 2628  
 2629  
 2630  
 2631  
 2632  
 2633  
 2634  
 2635  
 2636  
 2637  
 2638  
 2639  
 2640  
 2641  
 2642  
 2643  
 2644  
 2645  
 2646

652         Based on the *hsp65* metabarcoding analysis, water content was found to be explicative  
 653 of some distribution patterns. Shannon indices highlighted a high diversity within the sampled  
 654 sediments but similar values could indicate a low variability between the samples in a same  
 655 area. The lower diversity within the NP2 sample (according to its Shannon index) could be  
 656 explained by the low reads number, also explained by the high humidity rate of this sample  
 657 (max humidity  $\geq 115\%$ ). In addition, the low values of Simpson diversity indices have shown a  
 658 not homogenous diversity revealing that some communities are much more abundant than  
 659 others (Table 3). In this study, we observed that a high water content ( $\geq 112\%$ ) was related to

2647  
 2648  
 2649 660 the higher number of *N. abscessus* and *N. nova hsp65* reads, and intermediate conditions  
 2650  
 2651 661 (around 72% sediment moisture) led to the higher number of *N. cyriacigeorgica hsp65* reads.  
 2652  
 2653  
 2654  
 2655 662 These observations suggest *N. cyriacigeorgica* to be the most worrisome species as its  
 2656  
 2657 663 environmental conditions for isolation are those present the most part of the year in the studied  
 2658  
 2659 664 system and besides, according to Zoropogui et al., (2013) this species presents a likely ongoing  
 2660  
 2661 665 evolution towards a higher tropism for the human host. This led us to further investigate the  
 2662  
 2663 666 SIS *N. cyriacigeorgica* isolates. The phylogenetical analysis demonstrated close relationships  
 2664  
 2665 667 between the clinical and SIS *N. cyriacigeorgica* of this study. SIS strains and sequences were  
 2666  
 2667 668 distributed into two phylogroups, PI and PIII, showing a close relationship with some clinical  
 2668  
 2669 669 strains (Figures 7a, 7b). Furthermore, a recent clinical strain from Lyon was also positioned in  
 2670  
 2671 670 one of the phylogroups harboring SIS's *N. cyriacigeorgica* strains. In fact, clinical strains and  
 2672  
 2673 671 environmental ones could not be segregated into distinct clusters. This supports the idea that all  
 2674  
 2675 672 strains of *N. cyriacigeorgica* represent a human health hazard. Direct exposures through  
 2676  
 2677 673 inhalation could thus result in pulmonary nocardiosis. However, the frequency of the  
 2678  
 2679 674 interactions with the human host could have generated a gradient of virulence potentialities  
 2680  
 2681 675 going from mild to severe. This hypothesis was verified with the results of the genomic and 'in  
 2682  
 2683 676 vivo' comparison of GUH-2 and EML446 strains.  
 2684  
 2685  
 2686  
 2687 677 Regarding the genomic analysis, the genome size of SIS *N. cyriacigeorgica* EML446  
 2688  
 2689 678 (6,530,670 bp) was found to be larger than the one of clinical GUH-2 (6,194,645 bp). In general,  
 2690  
 2691 679 opportunistic pathogens present in an environmental reservoir harbor a larger genome,  
 2692  
 2693 680 conferring a greater versatility in the use of nutrients and in the ability to resist at certain  
 2694  
 2695 681 environmental constraints (Moran, 2002). However, the differences in genome size between  
 2696  
 2697 682 EML446 and clinical GUH-2 are low, and not in favor of a size reduction related to greater  
 2698  
 2699 683 interactions with the human host. Furthermore, the content in virulence genes between these  
 2700  
 2701  
 2702  
 2703  
 2704  
 2705  
 2706



2707  
 2708  
 2709 684 strains did not differ significantly but its distribution is variable in both genomes. Indeed,  
 2710  
 2711 685 Zoropogui et al., (2013) had already demonstrated that part of the virulence genes of clinical  
 2712  
 2713 686 GUH-2 strain is contained in the RGPs (region of genomic plasticity) (Figure 8b). In fact,  
 2714  
 2715 687 several CDSs found in *N. cyriacigeorgica* EML446 could play part in lung colonization. For  
 2716  
 2717 688 example, *mbt* is involved in the development of slow-growing bacteria in tissues under iron  
 2718  
 2719 689 limitations, *e.g.* in the lung (McMahon et al., 2012). In addition, the presence of CDSs coding  
 2720  
 2721 690 for lipoproteins may contribute at the intracellular lifestyle of *N. cyriacigeorgica*. Actually, Li  
 2722  
 2723 691 et al., (2018) demonstrated that a large amount of lipoproteins improves survival of another  
 2724  
 2725 692 actinobacteria, *Mycobacterium smegmatis*, in macrophage cells and murine lungs. Finally,  
 2726  
 2727 693 CDSs such as PE\_PGRS30, PG\_PGRS33 and PE\_PGRS41, were shown to be essential for  
 2728  
 2729 694 entry and intracellular survival in macrophages (Camassa et al., 2017; Chatrath et al., 2016;  
 2730  
 2731 695 Deng et al., 2017). These virulence genes were also recorded in clinical *N. cyriacigeorgica*  
 2732  
 2733 696 GUH-2 strain. This suggests that virulence of these two strains on a mouse model (or in human)  
 2734  
 2735 697 should be similar. However, changes in regulatory pathways might have generated some  
 2736  
 2737 698 changes in the fine-tuning of the expression of virulence genes, and modified the clinical  
 2738  
 2739 699 outcomes. This is hardly detected by simple genomic comparisons, and would require gene  
 2740  
 2741 700 expression profile analyses as performed by Cruz-Rabadán et al., (2017). Nevertheless, it must  
 2742  
 2743 701 be noted that the GUH-2 phylogroup (PII) diverged early from the EML446 phylogroup (PIII),  
 2744  
 2745 702 suggesting adaptations and selection for distinct growth conditions. An on-going adaptation of  
 2746  
 2747 703 the GUH-2 lineage for the human thus remains possible, and this hypothesis thus needed to be  
 2748  
 2749 704 tested by animal experimentations.  
 2750  
 2751  
 2752  
 2753  
 2754

2755 705 The physiopathology of *N. cyriacigeorgica* has been extensively studied in  
 2756  
 2757 706 immunocompetent murine models (Schlaberg et al., 2008). However, nocardiosis has a higher  
 2758  
 2759 707 occurrence in immunocompromised patients, and this led us to use a transient immunoparalysis  
 2760  
 2761 708 (induced by mild CLP) mouse model to compare the virulence potentialities of GUH-2 and  
 2762  
 2763  
 2764  
 2765  
 2766

2767  
2768  
2769 709 EML446. This is the first report describing the use of this model system with *Nocardia* cells,  
2770  
2771 710 but previous validations had been performed with *P. aeruginosa* cells (Restagno et al., 2016).  
2772  
2773 711 Compared on this latter study, our *Nocardia* cell instillations at  $1.0 \times 10^6$  CFU/ CLP mouse led  
2774  
2775 712 to a lower survival at D8 (CLP-EML446 = 64%, CLP-GUH2 = 67%) than the one obtained  
2776  
2777 713 with *P. aeruginosa* at the same concentration after the same period of time (CLP=93%)  
2778  
2779 714 (Restagno et al., 2016). Furthermore, in our study, thirty days after GUH-2 instillations, a  
2780  
2781 715 second mortality wave decreased considerably this survival rate (CLP-GUH-2=44%), which  
2782  
2783 716 remained much lower than the one obtained with *P. aeruginosa*. When extrapolated to humans,  
2784  
2785 717 these differences in behavior become of high importance in diseases in which both *N.*  
2786  
2787 718 *cyriacigeorgica* and *P. aeruginosa* may cohabit. This has been the case in some patients with  
2788  
2789 719 cystic fibrosis, as reported by Rodriguez-Nava et al., (2015). Traditionally, in these cases,  
2790  
2791 720 primary antibiotic treatments will target *P. aeruginosa* because it is considered the main  
2792  
2793 721 pathogen associated with lung deteriorations. Our study shows that the infective process of *N.*  
2794  
2795 722 *cyriacigeorgica* must not be underestimated and that a treatment targeting both pathogens  
2796  
2797 723 should be performed. This strategy has already been applied, and improved the clinical  
2798  
2799 724 outcomes (Rodriguez-Nava et al., 2015).  
2800  
2801  
2802  
2803  
2804 725 It is to be noted that based on this study, a small window of immunoparalysis due to  
2805  
2806 726 CLP in mice was found sufficient to promote the colonization, persistence and dissemination  
2807  
2808 727 of *N. cyriacigeorgica*. This observation could also be extrapolated to humans for which during  
2809  
2810 728 a period of illness, the immune system of the patients is weak (diabetes, cancer, etc.) allowing  
2811  
2812 729 the colonization of *Nocardia* in the infected organ during this “immunosuppressive window”.  
2813  
2814 730 Indeed, some patients considered immunocompetent may have had a history of disease (Singh  
2815  
2816 731 et al., 2015). So, according to our observations, we can state that locations presenting  
2817  
2818 732 environmental conditions similar to the studied UIB in terms of humidity, metallic trace  
2819  
2820 733 elements and PAH pollution, may suppose an infective risk for weak populations.  
2821  
2822  
2823  
2824  
2825  
2826

2827  
2828  
2829 734 Our study presents some limitations. For example, we studied a single UIB with its own  
2830  
2831 735 geological, hydrological, chemical and vegetative characteristics. We must then be prudent in  
2832  
2833 736 extrapolating the obtained results to any other UIBs. In this work, we compared the virulence  
2834  
2835 737 of clinical and environmental strains of *N. cyriacigeorgica*, however just a single representative  
2836  
2837  
2838 738 of each has been chosen. So, obtained conclusions should be carefully extrapolated to all *N.*  
2839  
2840 739 *cyriacigeorgica* clinical and environmental strains.

2841  
2842  
2843 740 However, our work has several strengths. For the first time, an urban, humid and  
2844  
2845 741 polluted environment (an UIB) was used to study the spatiotemporal distribution of pathogens  
2846  
2847 742 such as *N. cyriacigeorgica*. Moreover, we used the MLSA approach with precise gene  
2848  
2849 743 concatenation (*rrs-hsp65-sodA-secA1*) to identify clonal lineages between clinical and  
2850  
2851 744 environmental strains of *N. cyriacigeorgica*. In addition, according to the results obtained in  
2852  
2853 745 this approach, we suggest that *N. cyriacigeorgica* should be referred to as a complex and no  
2854  
2855 746 longer as a species, taking into account the presence of three well-defined phylogroups for  
2856  
2857 747 which taxonomy has yet to be reviewed. We used, for the first time, the *hsp65* marker for the  
2858  
2859 748 metabarcoding approach, allowing us to evaluate *Nocardia* biodiversity and to directly detect  
2860  
2861 749 *N. cyriacigeorgica* in the urban sediments of an UIB. This new marker could also be used to  
2862  
2863 750 track *Nocardia* in other environments. For the first time, the hazardousness of an environmental  
2864  
2865 751 strain of *N. cyriacigeorgica* isolated from an UIB was studied by complete genome sequencing  
2866  
2867 752 and by a murine model of transient immunoparalysis, which better mimics the population most  
2868  
2869 753 frequently targeted by this pathogen.

## 2872 2873 2874 754 **5. Conclusion**

2875  
2876  
2877 755 This study presents, for the first time, a complete inventory of *Nocardia* pathogenic  
2878  
2879 756 species found in a HAP-polluted urban infiltration system. This study was made possible by  
2880  
2881 757 the development of an innovative metabarcoding *hsp65*-based approach. This led to the  
2882  
2883  
2884  
2885  
2886

2887  
 2888  
 2889 758 detection of the highly frequent species found in nocardiosis worldwide such as *N.*  
 2890  
 2891 759 *cyriacigeorgica*, *N. nova*, and *N. abscessus*. The number of reads per species were found related  
 2892  
 2893 760 with the field conditions. Up to 39 sequences representing 6 OTUs were found for *N.*  
 2894  
 2895 761 *cyriacigeorgica* which makes this species the most worrisome in this kind of environments  
 2896  
 2897 762 taking into account its epidemiologic characteristics. This led us to perform rounds of isolation  
 2898  
 2899 763 of this bacterial species, and investigate more deeply their molecular epidemiology. A MLSA  
 2900  
 2901 764 approach demonstrated a close proximity between the SIS *N. cyriacigeorgica* isolates and the  
 2902  
 2903 765 clinical ones. However, these strains were mostly distributed in phylogroup III, and not  
 2904  
 2905 766 recorded in the phylogroup II harboring the most virulent isolate recorded so far *i.e.* GUH-2.  
 2906  
 2907 767 This suggested a significant diversification between these strains that could be indicative of a  
 2908  
 2909 768 distinct tropism for the human host. This led us to compare the full genome of one SIS isolate  
 2910  
 2911 769 with the one of GUH-2. No distinction in their virulence gene contents could be made,  
 2912  
 2913 770 suggesting similar virulence potentialities. Experimentations were performed to test the  
 2914  
 2915 771 virulence differences among these strains (and phylogroups). GUH-2 strain was shown to be  
 2916  
 2917 772 the most virulent isolate in an immunoparalysis CLP mice model but EML446, the SIS isolate,  
 2918  
 2919 773 was also confirmed to be significantly virulent. This fact further supports the idea that all strains  
 2920  
 2921 774 of this species can be pathogenic but with variable clinical outcomes. The GUH-2 lineage seems  
 2922  
 2923 775 to be on-going an adaptation for animal hosts including humans. These differentiations linking  
 2924  
 2925 776 phylogroups and virulence will now need to be tested on a larger number of strains. The  
 2926  
 2927 777 presence of pathogenic *Nocardia* is strongly correlated to metallic trace elements and they can  
 2928  
 2929 778 be suggested to be indicators of their presence. On the other hand, we have observed a negative  
 2930  
 2931 779 correlation between PAHs and pathogenic *Nocardia*, so these pollutants cannot be used as  
 2932  
 2933 780 indicators of these bacteria. Overall, this study shows that humid and polluted environments  
 2934  
 2935 781 such as UIBs may represent a health hazard for adjacent populations through either direct  
 2936  
 2937 782 exposure or through an aerosolization of dusts harboring *N. cyriacigeorgica* cells. These  
 2938  
 2939  
 2940  
 2941  
 2942  
 2943  
 2944  
 2945  
 2946

2947  
2948  
2949 783 *Nocardia* cells could be used as a worst case scenario bacterial models for evaluating the  
2950  
2951 784 microbiological safety of urban areas.  
2952  
2953 785  
2954  
2955  
2956  
2957  
2958  
2959  
2960  
2961  
2962  
2963  
2964  
2965  
2966  
2967  
2968  
2969  
2970  
2971  
2972  
2973  
2974  
2975  
2976  
2977  
2978  
2979  
2980  
2981  
2982  
2983  
2984  
2985  
2986  
2987  
2988  
2989  
2990  
2991  
2992  
2993  
2994  
2995  
2996  
2997  
2998  
2999  
3000  
3001  
3002  
3003  
3004  
3005  
3006

3007  
3008  
3009 786 **Acknowledgment:** Florian Vautrin held a doctoral fellowship from the Auvergne-Rhône-  
3010  
3011 787 Alpes region. The authors thank the Institut Claude Bourgelat – Biovivo of VetAgro Sup for  
3012  
3013 788 animal facilities and the OTHU (Field Observatory for Urban Water Management,  
3014  
3015 789 <http://www.graie.org>) for access to the infiltration basin. The authors are grateful to Béatrice  
3016  
3017  
3018 790 Charton for her technical support on the *Nocardia* PCR detection, Audrey Dubost for her  
3019  
3020 791 bioinformatics knowledge, Christophe Martin for the first isolation of *N. cyriacigeorgica*  
3021  
3022 792 environmental strain and Jordan Brun for his technical support in bacteriology experiment.  
3023  
3024 793 **Source of funding:** This work was partly funded by l'Agence Nationale de la Recherche  
3025  
3026 794 through ANR-17-CE04-0010 (Infiltron) project, by LabEx IMU (Intelligence des Mondes  
3027  
3028 795 Urbains), the Greater-Lyon Urban Community, the French national research program for  
3029  
3030 796 environmental and occupational health of Anses under the terms of project “Iouqmer” EST  
3031  
3032 797 2016/1/120, the School of Integrated Watershed Sciences H2O'LYON (ANR 17-EURE-0018),  
3033  
3034 798 and the Urban School of Lyon. Funders did not interfere in the elaboration of the experiments  
3035  
3036 799 or data analysis.

3037  
3038  
3039 800

3040  
3041  
3042  
3043  
3044  
3045  
3046  
3047  
3048  
3049  
3050  
3051  
3052  
3053  
3054  
3055  
3056  
3057  
3058  
3059  
3060  
3061  
3062  
3063  
3064  
3065  
3066

3067  
3068  
3069  
3070  
3071  
3072  
3073  
3074  
3075  
3076  
3077  
3078  
3079  
3080  
3081  
3082  
3083  
3084  
3085  
3086  
3087  
3088  
3089  
3090  
3091  
3092  
3093  
3094  
3095  
3096  
3097  
3098  
3099  
3100  
3101  
3102  
3103  
3104  
3105  
3106  
3107  
3108  
3109  
3110  
3111  
3112  
3113  
3114  
3115  
3116  
3117  
3118  
3119  
3120  
3121  
3122  
3123  
3124  
3125  
3126

801     **References**

802     Arrache, D., Zait, H., Rodriguez-Nava, V., Bergeron, E., Durand, T., Yahiaoui, M., Grenouillet,  
803     F., Amrane, A., Chaouche, F., Baiod, A., Madani, K., Hamrioui, B., 2018. Nocardiose  
804     cérébrale et pulmonaire à *Nocardia abscessus* chez un patient algérien  
805     immunocompétent. J. Mycol. Médicale 28, 531–537.  
806     <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.04.010>

807     Badin, A.L., Monier, A., Volatier, L., Geremia, R.A., Delolme, C., Bedell, J.-P., 2011.  
808     Structural stability, microbial biomass and community composition of sediments  
809     affected by the hydric dynamics of an urban stormwater infiltration basin: dynamics of  
810     physical and microbial characteristics of stormwater sediment. Microb. Ecol. 61, 885–  
811     897. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9829-4>

812     Barraud, S., Gibert, J., Winiarski, T., Krajewski, J.-L.B., 2002. Implementation of a monitoring  
813     system to measure impact of stormwater runoff infiltration. Water Sci. Technol. 45,  
814     203–210. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0080>

815     Beaman, B.L., Maslan, S., 1978. Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle.  
816     Infect. Immun. 20, 290–295.

817     Belles A, Alary C, Mamindy-Pajany Y, Abriak N-E. 2016. Relationship between the water-  
818     exchangeable fraction of PAH and the organic matter composition of sediments.  
819     Environ Pollut 219:512–518. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.077>

820     Bernardin-Souibgui C, Barraud S, Bourgeois E, Aubin J-B, Becouze-Lareure C, Wiest L, et al.  
821     2018. Incidence of hydrological, chemical, and physical constraints on bacterial  
822     pathogens, *Nocardia* cells, and fecal indicator bacteria trapped in an urban stormwater  
823     detention basin in Chassieu, France. Environ Sci Pollut Res Int.  
824     <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1994-2>

825     Budzinski H, Garrigues Ph, Connan J, Devillers J, Domine D, Radke M, et al. 1995. Alkylated  
826     phenanthrene distributions as maturity and origin indicators in crude oils and rock  
827     extracts. Geochim Cosmochim Acta 59:2043–2056; [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00125-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00125-5)

829     Camassa, S., Palucci, I., Iantomasi, R., Cubeddu, T., Minerva, M., De Maio, F., Jouny, S.,  
830     Petrucchioli, E., Goletti, D., Ria, F., Sali, M., Sanguinetti, M., Manganelli, R., Rocca, S.,  
831     Brodin, P., Delogu, G., 2017. Impact of PE\_PGRS33 gene polymorphisms on  
832     *Mycobacterium tuberculosis* infection and pathogenesis. Front. Cell. Infect. Microbiol.  
833     7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00137>

834     Charif, D., Thioulouse, J., Lobry, J.R., Perri re, G., 2005. Online synonymous codon usage  
835     analyses with the ade4 and seqinR packages. Bioinformatics 21, 545–547.  
836     <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti037>

837     Chatrath, S., Gupta, V.K., Dixit, A., Garg, L.C., 2016. PE\_PGRS30 of *Mycobacterium*  
838     *tuberculosis* mediates suppression of proinflammatory immune response in



3127  
3128  
3129 839 macrophages through its PGRS and PE domains. *Microbes Infect.* 18, 536–542.  
3130 840 <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.04.004>  
3131  
3132 841 Chulan, F., Yanpeng, L., Pengxia, L., Feifei, M., Zhengsheng, X., Rui, L., Yuzhen, Q., Beibei,  
3133 842 W., Cheng, J., 2019. Characteristics of airborne opportunistic pathogenic bacteria  
3134 843 during autumn and winter in Xi'an, China. *Sci. Total Environ.*  
3135 844 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.412>  
3136  
3137  
3138 845 CLSI. MM18AE: DNA target sequencing & bacteria & fungi ID. Available:  
3139 846 <https://www.clsi.org/standards/products/molecular-methods/documents/mm18/>  
3140 847 [accessed 19 April 2019].  
3141  
3142 848 Cruz-Rabadán, J.S., Miranda-Ríos, J., Espín-Ocampo, G., Méndez-Tovar, L.J., Maya-Pineda,  
3143 849 H.R., Hernández-Hernández, F., 2017. Non-coding RNAs are differentially expressed  
3144 850 by *Nocardia brasiliensis* *in Vitro* and in experimental actinomycetoma. *Open*  
3145 851 *Microbiol. J.* 11, 112–125. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010112>  
3146  
3147 852 Cui, Q., Fang, T., Huang, Y., Dong, P., Wang, H., 2017. Evaluation of bacterial pathogen  
3148 853 diversity, abundance and health risks in urban recreational water by amplicon next-  
3149 854 generation sequencing and quantitative PCR. *J. Environ. Sci.* 57, 137–149.  
3150 855 <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.11.008>  
3151  
3152  
3153 856 Deng, W., Long, Q., Zeng, J., Li, P., Yang, W., Chen, X., Xie, J., 2017. *Mycobacterium*  
3154 857 *tuberculosis* PE\_PGRS41 enhances the intracellular survival of *M. smegmatis* within  
3155 858 macrophages via blocking innate immunity and inhibition of host defense. *Sci. Rep.* 7.  
3156 859 <https://doi.org/10.1038/srep46716>  
3157  
3158 860 Eshraghi, S.S., Heidarzadeh, S., Soodbakhsh, A., Pourmand, M., Ghasemi, A., GramiShoar,  
3159 861 M., Zibafar, E., Aliramezani, A., 2014. Pulmonary nocardiosis associated with cerebral  
3160 862 abscess successfully treated by co-trimoxazole: a case report. *Folia Microbiol. (Praha)*  
3161 863 59, 277–281. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0298-7>  
3162  
3163 864 Feldman, A.T., Wolfe, D., 2014. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining, in:  
3164 865 histopathology, methods in molecular biology. Humana Press, New York, NY, pp. 31–  
3165 866 43. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3)  
3166  
3167  
3168 867 Friendly, M., 2002. Corrgams: exploratory displays for correlation matrices. *Am. Stat.* 56,  
3169 868 316–324. <https://doi.org/10.1198/000313002533>  
3170  
3171 869 Garcia-Bellmunt, L., Sibila, O., Solanes, I., Sanchez-Reus, F., Plaza, V., 2012. Pulmonary  
3172 870 nocardiosis in patients with COPD: characteristics and prognostic factors. *Arch.*  
3173 871 *Bronconeumol. Engl. Ed.* 48, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2012.06.006>  
3174  
3175 872 Gilbert, B., McDonald, I.R., Finch, R., Stafford, G.P., Nielsen, A.K., Murrell, J.C., 2000.  
3176 873 Molecular analysis of the pmo (particulate methane monooxygenase) operons from two  
3177 874 type II methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 966–975.  
3178 875 <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.966-975.2000>  
3179  
3180  
3181  
3182  
3183  
3184  
3185  
3186

3187  
3188  
3189 876 Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user  
3190 877 interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27,  
3191 878 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>  
3192  
3193  
3194 879 Heise ER. 1982. Diseases associated with immunosuppression. *Environ Health Perspect* 11.  
3195 880 <https://doi.org/10.1289/ehp.82439>.  
3196  
3197 881 Kaushik R, Balasubramanian R, de la Cruz AA. 2012. Influence of air quality on the  
3198 882 composition of microbial pathogens in fresh rainwater. *Appl Environ Microbiol.*  
3199 883 78(8):2813-8. <https://doi.org/10.1128/AEM.07695-11>  
3200  
3201 884 Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis  
3202 885 version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.  
3203 886 <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>  
3204  
3205 887 Lebeaux, D., Bergeron, E., Berthet, J., Djadi-Prat, J., Mouniée, D., Boiron, P., Lortholary, O.,  
3206 888 Rodriguez-Nava, V., 2018. Antibiotic susceptibility testing and species identification of  
3207 889 *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory,  
3208 890 2010–2015. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.013>  
3209  
3210 891 L   Cao, K.-A., Boitard, S., Besse, P., 2011. Sparse PLS discriminant analysis: biologically  
3212 892 relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC*  
3213 893 *Bioinformatics* 12, 253. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-253>  
3214  
3215 894 Li, F., Feng, L., Jin, C., Wu, X., Fan, L., Xiong, S., Dong, Y., 2018. LpqT improves  
3216 895 mycobacteria survival in macrophages by inhibiting TLR2 mediated inflammatory  
3217 896 cytokine expression and cell apoptosis. *Tuberculosis* 111, 57–66.  
3218 897 <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.05.007>  
3219  
3220 898 Li, J., Shang, X., Zhao, Z., Tanguay, R.L., Dong, Q., Huang, C., 2010. Polycyclic aromatic  
3221 899 hydrocarbons in water, sediment, soil, and plants of the Aojiang River waterway in  
3222 900 Wenzhou, China. *J. Hazard. Mater.* 173, 75–81.  
3223 901 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.050>  
3224  
3225 902 Luo, Q., Hiessl, S., Poehlein, A., Daniel, R., Steinbüchel, A., 2014a. Insights into the microbial  
3226 903 degradation of rubber and gutta-percha by analysis of the complete genome of *Nocardia*  
3227 904 *nova* SH22a. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3895–3907.  
3228 905 <https://doi.org/10.1128/AEM.00473-14>  
3230  
3231 906 Luo, Q., Hiessl, S., Steinbüchel, A., 2014b. Functional diversity of *Nocardia* in metabolism.  
3232 907 *Environ. Microbiol.* 16, 29–48. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12221>  
3233  
3234 908 Marti, R., Becouze-Lareure, C., Ribun, S., Marjolet, L., Bernardin Souibgui, C., Aubin, J.-B.,  
3235 909 Lipeme Kouyi, G., Wiest, L., Blaha, D., Cournoyer, B., 2017. Bacteriome genetic  
3236 910 structures of urban deposits are indicative of their origin and impacted by chemical  
3237 911 pollutants. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13594-8>  
3238  
3239 912 McMahan, M.D., Rush, J.S., Thomas, M.G., 2012. Analyses of *mbtB*, *mbtE*, and *mbtF* suggest  
3240 913 revisions to the mycobactin biosynthesis pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *J.*  
3241 914 *Bacteriol.* 194, 2809–2818. <https://doi.org/10.1128/JB.00088-12>  
3242  
3243  
3244  
3245  
3246

- 3247  
3248  
3249 915 McTaggart, L.R., Richardson, S.E., Witkowska, M., Zhang, S.X., 2010. Phylogeny and  
3250 916 identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. J. Clin.  
3251 917 Microbiol. 48, 4525–4533. <https://doi.org/10.1128/JCM.00883-10>  
3252  
3253 918 Moran, N.A., 2002. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. Cell 108,  
3254 919 583–586. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00665-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00665-7)  
3255  
3256  
3257 920 Muntean, N., Muntean, E., Duda, M.M., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil.  
3258 921 ResearchGate.  
3259  
3260 922 Nádudvari Á, Fabiańska MJ. 2015. Coal-related sources of organic contamination in sediments  
3261 923 and water from the Bierawka River (Poland). Int J Coal Geol 152:94–109;  
3262 924 <https://doi.org/10.1016/j.coal.2015.11.006>  
3263  
3264 925 Nemzek, J.A., Xiao, H.-Y., Minard, A.E., Bolgos, G.L., Remick, D.G., 2004. Humane  
3265 926 endpoints in shock research. Shock Augusta Ga 21, 17–25.  
3266 927 <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000101667.49265.fd>  
3267  
3268 928 Nhi-Cong, L.T., Mikolasch, A., Awe, S., Sheikhany, H., Klenk, H.-P., Schauer, F., 2010.  
3269 929 Oxidation of aliphatic, branched chain, and aromatic hydrocarbons by *Nocardia*  
3270 930 *cyriacigeorgica* isolated from oil-polluted sand samples collected in the Saudi Arabian  
3271 931 Desert. J. Basic Microbiol. 50, 241–253. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900358>  
3272  
3273  
3274 932 Pujic, P., Beaman, B.L., Ravalison, M., Boiron, P., Rodríguez-Nava, V., 2015. Chapter 40 -  
3275 933 *Nocardia* and *Actinomyces*, in: Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I.,  
3276 934 Schwartzman, J. (Eds.), Molecular Medical Microbiology (Second Edition). Academic  
3277 935 Press, Boston, pp. 731–752. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00040-8>  
3278  
3279 936 Quatrini, P., Scaglione, G., Pasquale, C.D., Riela, S., Puglia, A.M., 2008. Isolation of Gram-  
3280 937 positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline.  
3281 938 J. Appl. Microbiol. 104, 251–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03544.x>  
3282  
3283 939 Radke M, Welte DH, Willsch H. 1986. Maturity parameters based on aromatic hydrocarbons:  
3284 940 Influence of the organic matter type. Org Geochem 10:51–63;  
3285 941 [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(86\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0146-6380(86)90008-2)  
3286  
3287  
3288 942 Rahmati, M., Weihermüller, L., Vanderborght, J., Pachepsky, Y.A., Mao, L., Sadeghi, S.H.,  
3289 943 Moosavi, N., Kheirfam, H., Montzka, C., Van Looy, K., Toth, B., Hazbavi, Z., Al  
3290 944 Yamani, W., Albalasmeh, A.A., Alghzawi, M.Z., Angulo-Jaramillo, R., Antonino,  
3291 945 A.C.D., Arampatzis, G., Armindo, R.A., Asadi, H., Bamutaze, Y., Batlle-Aguilar, J.,  
3292 946 Béchet, B., Becker, F., Blöschl, G., Bohne, K., Braud, I., Castellano, C., Cerdà, A.,  
3293 947 Chalhoub, M., Cichota, R., Císlarová, M., Clothier, B., Coquet, Y., Cornelis, W.,  
3294 948 Corradini, C., Coutinho, A.P., de Oliveira, M.B., de Macedo, J.R., Durães, M.F.,  
3295 949 Emami, H., Eskandari, I., Farajnia, A., Flammini, A., Fodor, N., Gharaibeh, M.,  
3296 950 Ghavimipannah, M.H., Ghezzehei, T.A., Giertz, S., Hatzigiannakis, E.G., Horn, R.,  
3297 951 Jiménez, J.J., Jacques, D., Keesstra, S.D., Kelishadi, H., Kiani-Harchegani, M.,  
3298 952 Kouselou, M., Kumar Jha, M., Lassabatere, L., Li, X., Liebig, M.A., Lichner, L., López,  
3299 953 M.V., Machiwal, D., Mallants, D., Mallmann, M.S., de Oliveira Marques, J.D.,  
3300 954 Marshall, M.R., Mertens, J., Meunier, F., Mohammadi, M.H., Mohanty, B.P., Pulido-  
3301 955 Moncada, M., Montenegro, S., Morbidelli, R., Moret-Fernández, D., Moosavi, A.A.,  
3302  
3303  
3304  
3305  
3306

3307  
3308  
3309 956 Mosaddeghi, M.R., Mousavi, S.B., Mozaffari, H., Nabiollahi, K., Neyshabouri, M.R.,  
3310 957 Ottoni, M.V., Ottoni Filho, T.B., Pahlavan-Rad, M.R., Panagopoulos, A., Peth, S.,  
3311 958 Peyneau, P.-E., Picciafuoco, T., Poesen, J., Pulido, M., Reinert, D.J., Reinsch, S.,  
3312 959 Rezaei, M., Roberts, F.P., Robinson, D., Rodrigo-Comino, J., Rotunno Filho, O.C.,  
3313 960 Saito, T., Suganuma, H., Saltalippi, C., Sándor, R., Schütt, B., Seeger, M., Sepehrnia,  
3314 961 N., Sharifi Moghaddam, E., Shukla, M., Shutaro, S., Sorando, R., Stanley, A.A.,  
3315 962 Strauss, P., Su, Z., Taghizadeh-Mehrjardi, R., Taguas, E., Teixeira, W.G., Vaezi, A.R.,  
3316 963 Vafakhah, M., Vogel, T., Vogeler, I., Votrubova, J., Werner, S., Winarski, T., Yilmaz,  
3317 964 D., Young, M.H., Zacharias, S., Zeng, Y., Zhao, Y., Zhao, H., Vereecken, H., 2018.  
3318 965 Development and analysis of the Soil Water Infiltration Global database. Earth Syst.  
3319 966 Sci. Data 10, 1237–1263. <https://doi.org/10.5194/essd-10-1237-2018>  
3320  
3321  
3322 967 Restagno, D., Venet, F., Paquet, C., Freyburger, L., Allaouchiche, B., Monneret, G., Bonnet,  
3323 968 J.-M., Louzier, V., 2016. Mice survival and plasmatic cytokine secretion in a “two hit”  
3324 969 model of sepsis depend on intratracheal *Pseudomonas Aeruginosa* bacterial load. PLoS  
3325 970 ONE 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162109>  
3326  
3327 971 Rodriguez-Nava, V., Couble, A., Devulder, G., Flandrois, J.-P., Boiron, P., Laurent, F., 2006.  
3328 972 Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65*  
3329 973 gene-based identification of *Nocardia* species. J. Clin. Microbiol. 44, 536–546.  
3330 974 <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.536-546.2006>  
3331  
3332  
3333 975 Rodriguez-Nava, V., Durupt, S., Chyderiotis, S., Freydière, A.-M., Karsenty, J., de Montclos,  
3334 976 M., Reix, P., Durieu, I., Nove-Josserand, R., Chiron, R., Bremont, F., Têtu, L., Murris,  
3335 977 M., Terru, D., Godreuil, S., Bergeron, E., Freney, J., Boiron, P., Vandenesch, F.,  
3336 978 Marchandin, H., Segonds, C., Doléans-Jordheim, A., 2015. A French multicentric study  
3337 979 and review of pulmonary *Nocardia* spp. in cystic fibrosis patients. Med. Microbiol.  
3338 980 Immunol. (Berl.) 204, 493–504. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0360-3>  
3339  
3340 981 Rudramurthy, S.M., Honnavar, P., Kaur, H., Samanta, P., Ray, P., Ghosh, A., Chakrabarti, A.,  
3341 982 2015. Molecular identification of clinical *Nocardia* isolates from India. J. Med.  
3342 983 Microbiol. 64, 1216–1225. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000143>  
3343  
3344 984 Schlager, R., Huard, R.C., Della-Latta, P., 2008. *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging  
3345 985 pathogen in the United States. J. Clin. Microbiol. 46, 265–273.  
3346 986 <https://doi.org/10.1128/JCM.00937-07>  
3347  
3348 987 Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski,  
3349 988 R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G.,  
3350 989 Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-  
3351 990 independent, community-supported software for describing and comparing microbial  
3352 991 communities. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7537–7541.  
3353 992 <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>  
3354  
3355  
3356 993 Sébastien, C., Barraud, S., Ribun, S., Zoropogui, A., Blaha, D., Becouze-Lareure, C., Kouyi,  
3357 994 G.L., Cournoyer, B., 2014. Accumulated sediments in a detention basin: chemical and  
3358 995 microbial hazard assessment linked to hydrological processes. Environ. Sci. Pollut. Res.  
3359 996 21, 5367–5378. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2397-z>  
3360  
3361  
3362  
3363  
3364  
3365  
3366

3367  
3368  
3369 997 Singh, I., West, F.M., Sanders, A., Hartman, B., Zappetti, D., 2015. Pulmonary nocardiosis in  
3370 998 the immunocompetent host: case series. Case Rep. Pulmonol. 2015, 1–6.  
3371 999 <https://doi.org/10.1155/2015/314831>  
3372  
3373  
3374 1000 Steinbrink, J., Leavens, J., Kauffman, C.A., Miceli, M.H., 2018. Manifestations and outcomes  
3375 1001 of *Nocardia* infections: Comparison of immunocompromised and  
3376 1002 nonimmunocompromised adult patients. Medicine (Baltimore) 97, e12436.  
3377 1003 <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012436>  
3378  
3379 1004 Valdezate, S., Garrido, N., Carrasco, G., Medina-Pascual, M.J., Villalón, P., Navarro, A.M.,  
3380 1005 Saéz-Nieto, J.A., 2016. Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the  
3381 1006 main *Nocardia* species in Spain. J. Antimicrob. Chemother. dkw489.  
3382 1007 <https://doi.org/10.1093/jac/dkw489>  
3383  
3384 1008 Vallenet D, Calteau A, Cruveiller S, Gachet M, Lajus A, Josso A, et al. 2017. MicroScope in  
3385 1009 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of  
3386 1010 microbial genomes. Nucleic Acids Res 45:D517–D528.  
3387 1011 <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1101>  
3388  
3389 1012 Vautrin, F., Bergeron, E., Dubost, A., Abrouk, D., Martin, C., Cournoyer, B., Louzier, V.,  
3390 1013 Winiarski, T., Rodriguez-Nava, V., Pujic, P., 2019. Genome sequences of three  
3391 1014 *Nocardia cyriacigeorgica* strains and one *Nocardia asteroides* strain. Microbiol.  
3392 1015 Resour. Announc. 8, e00600-19, /mra/8/33/MRA.00600-19.atom.  
3393 1015 <https://doi.org/10.1128/MRA.00600-19>  
3394 1016  
3395  
3396 1017 Verzani, J., 2004. Using R for introductory statistics. Chapman and Hall/CRC.  
3397 1018 <https://doi.org/10.4324/9780203499894>  
3398  
3399 1019 Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naïve bayesian classifier for rapid  
3400 1020 assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl. Environ.  
3401 1021 Microbiol. 73, 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>  
3402  
3403 1022 Winiarski T. Fonction filtration d'un ouvrage urbain - consequence sur la formation d'un  
3404 1023 anthroposol. 2015. Available: [http://temis.documentation.developpement-](http://temis.documentation.developpement-durable.gouv.fr/docs/Temis/0081/Temis-0081850/21970_A.pdf)  
3405 1024 [durable.gouv.fr/docs/Temis/0081/Temis-0081850/21970\\_A.pdf](http://temis.documentation.developpement-durable.gouv.fr/docs/Temis/0081/Temis-0081850/21970_A.pdf) 199 p [accessed 19  
3406 1025 April 2019].  
3407  
3408  
3409 1026 Xiao, M., Pang, L., Chen, S.C.-A., Fan, X., Zhang, L., Li, H.-X., Hou, X., Cheng, J.-W., Kong,  
3410 1027 F., Zhao, Y.-P., Xu, Y.-C., 2016. Accurate identification of common pathogenic  
3411 1028 *Nocardia* species: evaluation of a multilocus sequence analysis platform and matrix-  
3412 1029 assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. PLOS ONE 11,  
3413 1030 e0147487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147487>  
3414  
3415 1031 Yassin, A.F., Rainey, F.A., Steiner, U., 2001. *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov.. Int. J. Syst.  
3416 1032 Evol. Microbiol. 51, 1419–1423. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1419>  
3417  
3418 1033 Yunker MB, Macdonald RW, Vingarzan R, Mitchell RH, Goyette D, Sylvestre S. 2002. PAHs  
3419 1034 in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source  
3420 1035 and composition. Org Geochem 33:489–515; [https://doi.org/10.1016/S0146-](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(02)00002-5)  
3421 1036 [6380\(02\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(02)00002-5)  
3422  
3423  
3424  
3425  
3426



3427  
3428  
3429 1037 Zoropogui, A., Pujic, P., Normand, P., Barbe, V., Belli, P., Graindorge, A., Roche, D., Vallenet,  
3430 1038 D., Mangenot, S., Boiron, P., Rodriguez-Nava, V., Ribun, S., Richard, Y., Cournoyer,  
3431 1039 B., Blaha, D., 2013. The *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2 genome shows ongoing  
3432 1040 adaptation of an environmental Actinobacteria to a pathogen's lifestyle. BMC  
3433 1041 Genomics 14, 286. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-286>  
3434  
3435  
3436 1042  
3437  
3438  
3439  
3440  
3441  
3442  
3443  
3444  
3445  
3446  
3447  
3448  
3449  
3450  
3451  
3452  
3453  
3454  
3455  
3456  
3457  
3458  
3459  
3460  
3461  
3462  
3463  
3464  
3465  
3466  
3467  
3468  
3469  
3470  
3471  
3472  
3473  
3474  
3475  
3476  
3477  
3478  
3479  
3480  
3481  
3482  
3483  
3484  
3485  
3486

**Declaration of interests**

☐ The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☐ The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:





## Conclusions du chapitre 2

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence pour la première fois que les paramètres physico-chimiques peuvent influencer la distribution en *Nocardia* dans un environnement urbain. Nous avons trouvé des valeurs de HAP de l'ordre de 2 à 3,5 mg/kg de sédiments, comparables à des sols pollués d'une région industrielle chinoise (Li *et al.*, 2010). Ces HAP se répartissent en suivant deux tendances de comportement au sein du bassin d'infiltration : le fluoranthène, le pyrène, le phénanthrène, le benzo(a)anthracène et le benzo(a)pyrène seraient influencés par la zone du bassin car ils sont plus abondants dans la zone d'arrivée très riche en eau, tandis que le naphthalène, l'acénaphthène, le fluorène, le benzo(b)fluoranthène, le dibenzo(a,h)anthracène, le benzo(ghi)pérylène et l'indeno(1,2,3-cd)pyrène, seraient quant à eux influencés par la période d'échantillonnage avec de plus fortes proportions en été. Cependant, aucune relation directe n'a pu être observée entre la présence de ces contaminants et celle de *Nocardia* pathogènes. Néanmoins, la présence d'espèces pathogènes de *Nocardia* telles que *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. nova* et *N. otitidiscaviarum* semble plutôt être corrélée à la présence d'ETM, notamment le plomb, le zinc et le mercure, en plus d'une corrélation légèrement négative avec l'humidité.

En ce qui concerne l'étude phylogénétique entre des souches de *N. cyriacigeorgica* d'origine clinique et environnementale, nous avons confirmé une forte diversité infraspécifique avec une répartition en trois phylogroupes (PI, PII et PIII) sur une collection de souches cliniques françaises mais aussi pour la première fois de souches issues de cet environnement. Les souches isolées à partir des sédiments du bassin d'infiltration se regroupent toutes dans le PIII, mais des séquences de cette espèce obtenue par métabarcoding se placent également dans le PI. En revanche, nous n'avons aucun isolat ni séquence provenant de l'environnement se plaçant dans le PII contenant la souche hautement virulente GUH-2.

L'existence d'une forte diversité infraspécifique au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* est le résultat de différences génétiques au niveau de plusieurs gènes de ménage conduisant à l'apparition de trois phylogroupes. De plus, leur présence dans des biotopes très différents (hôte humain ou environnement pollué) pourrait évoquer un processus d'adaptation de cette bactérie à un habitat particulier, pouvant conduire à l'exacerbation de certains caractères propres à chaque phylogroupe, que ce soit en terme de virulence, de résistance aux polluants ou de résistance aux antibiotiques entre autres. En conclusion, cette diversité au sein de cette espèce peut donc révéler une possible évolution continue installée au cours du temps, ce qui pourrait aboutir à terme à une spéciation en trois espèces distinctes, découlant des trois phylogroupes décrits.

Les travaux d'expérimentation animale réalisés dans le cadre de cette expérience utilisent un modèle murin d'immunoparalysie transitoire. Le principe de ce modèle est d'induire une première attaque consistant en un choc septique immédiatement traité et suivi

d'une deuxième attaque par inoculation de *N. cyriacigeorgica* au moment durant lequel le statut immunitaire des souris est revenu à la normale. Cependant, le contact avec *Nocardia* a fortement affecté les souris mettant en évidence une « fenêtre d'immunodépression » pendant laquelle, même si leur système immunitaire était considéré comme rétabli à la suite du premier choc septique, le contact avec *N. cyriacigeorgica* s'est avéré fatal dans un grand nombre de cas. Il en ressort une dose infectante (DI 50 : nombre des microorganismes provoquant la maladie de 50 % des animaux inoculés) estimée à  $1,0 \times 10^6$  UFC/souris et une dose létale (DL 50) à  $1,0 \times 10^7$  UFC/souris.

Si nous comparons la dose infectante de  $1,0 \times 10^6$  UFC de *Nocardia* par souris à celle de  $1,0 \times 10^7$  UFC de *Pseudomonas aeruginosa* obtenue sur le même modèle murin et dans des conditions expérimentales similaires ([Restagno et al., 2016](#)), on peut supposer que *Nocardia* serait virulente à une plus faible dose. Cette donnée nous invite à remettre en question la signification clinique de *N. cyriacigeorgica*, par exemple lorsqu'elle est retrouvée dans des cas de co-infection avec *P. aeruginosa* chez des patients atteints de mucoviscidose. En effet, *N. cyriacigeorgica* est souvent considérée comme un agent colonisateur des poumons mais compte tenu de cette plus grande virulence, elle devrait être considérée comme possible co-responsable de l'état physiopathologique du patient et dans certains cas, être prise en compte au moment du choix thérapeutique du patient afin d'éviter une éventuelle rechute liée à une nocardiose, comme ont pu le démontrer [Rodriguez-Nava et al., \(2015\)](#) chez des patients atteints de mucoviscidose.

Enfin, la question de la dose pouvant induire une infection chez les souris a été soulevée par ces travaux. La dose infectante a été estimée à  $1,0 \times 10^6$  UFC/ souris mais nous avons détecté dans les sédiments du bassin d'infiltration Django-Reinhardt par méthode culturale des doses de seulement  $1,0 \times 10^3$  UFC/ g de sédiment. Cependant, des inoculations à cette concentration ont également été effectuées et ont tout de même permis la détection de *Nocardia* dans les organes des souris ne montrant pas de signes cliniques, laissant entrevoir une possible colonisation. Les sédiments urbains de ce bassin d'infiltration pourraient donc être considérés comme de potentiels responsables de colonisation chez certaines populations fragiles (enfants, personnes âgées, immunodéprimées, maladies pulmonaires chroniques, etc.). Une fois la colonisation établie, le passage vers l'infection pourrait être liée à plusieurs facteurs comme la virulence de certains clones de *N. cyriacigeorgica* ainsi que la durée de l'exposition à ce pathogène.

Le séquençage de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 et EML446 a permis de démontrer qu'il n'y a pas de différence significative en terme de contenu en gènes de virulence à l'intérieur de ces deux génomes. De nombreux CDS (coding DNA sequences) présents dans les deux génomes ont été démontrés pour être impliqués dans des mécanismes infectieux, notamment dans la colonisation des poumons comme les gènes *mbt* qui favorisent le développement dans des environnements limitant en fer, ou le PE\_PGRS qui permet le développement intracellulaire dans les macrophages. Pourtant, la souche GUH-2 présente une dangerosité

plus importante qu'EML446 avec une mortalité des souris plus forte (66 % de mortalité vs 46 % respectivement). Cette différence pourrait s'expliquer par des taux d'expression variables des gènes de virulence mais les souches environnementales de l'espèce *N. cyriacigeorgica* semblent tout de même capables d'induire la nocardiose.

En conclusion, ces travaux ont permis d'isoler pour la première fois en Europe plusieurs souches environnementales de l'espèce pathogène *N. cyriacigeorgica*. C'est également la première fois que des souches issues de l'environnement ont été incluses dans des travaux de physiopathologie sur modèle animal et comparées à des souches provenant de patients atteints de nocardiose. Nous soulevons donc ici le risque potentiel des environnements urbains, ou anthropisés et pollués en règle générale, sur l'épidémiologie de la nocardiose.



**CHAPITRE III**

**IDENTIFICATION DE *NOCARDIA* PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI ToF**





#### Préambule

Depuis une quinzaine d'années, une nouvelle technique s'est largement développée et elle est en train de devenir la référence pour l'identification bactérienne. Pour l'heure, elle est déjà très largement répandue dans les hôpitaux pour le diagnostic de nombreuses maladies causées par les espèces bactériennes de plus forte prévalence ainsi que les levures. Il s'agit de la spectrométrie de masse de type MALDI-ToF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight Mass Spectrometry) (Seng *et al.*, 2009).

Cette technique, basée sur la spectrométrie de masse, permet l'identification bactérienne par analyse des protéines contenues dans les bactéries (Wang *et al.*, 1992). Les fragments obtenus par ionisation sont ensuite confrontés à une base de données pour l'identification. Cette base de données est constituée de souches types ainsi que d'autres isolées chez des patients et permet une identification fiable lorsque le pourcentage d'homologie entre les spectres de la base de données et celui de l'échantillon est fort (Clark *et al.*, 2013). Certaines bactéries, telles que les *Staphylocoques* ou *Pseudomonas* peuvent être très facilement identifiées par dépôt direct de l'échantillon, *i.e.* que quelques colonies de bactéries sont déposées sur la cible et fixées par la matrice de dépôt sans étape préliminaire d'extraction des protéines (Mesureur *et al.*, 2016).

Cependant, certains genres bactériens se montrent plus réfractaires à l'identification par cette technologie, ce qui est notamment le cas des Actinobactéries dont font partie les *Mycobacterium* ou les *Nocardia*. En effet, ces bactéries possèdent une paroi lipidique épaisse et riche en acides mycoliques. Ces deux propriétés rendent la membrane difficile à ioniser par MALDI-ToF MS sans étape préliminaire d'extraction des protéines (Verroken *et al.*, 2010). Parmi les deux systèmes les plus commercialisés, la base de données Vitek® MS V2 de bioMérieux ne possédait aucun spectre de *Mycobacterium* ni de *Nocardia* (Girard *et al.*, 2016) et plusieurs auteurs avaient souligné la nécessité d'enrichir cette base de données (Mather *et al.*, 2014 ; Paściak *et al.*, 2015). En effet, leurs expériences avaient démontré que des bases de données « maisons », *i.e.* avec des spectres qu'ils avaient eux-mêmes rajoutés, permettaient des taux d'identification bien supérieurs à ceux obtenus avec les bases de données des constructeurs ne contenant que peu ou pas de spectres de *Nocardia*. L'autre système, celui du fournisseur Allemand Bruker, ne possédait quant à lui qu'une vingtaine d'espèces représentées par peu de souches (Verroken *et al.*, 2010). Ces deux freins rendaient l'identification du genre *Nocardia* de façon fiable par spectrométrie de masse encore impossible pour l'heure en routine dans les hôpitaux (Pasciak *et al.*, 2015).

Un autre point qui ne fait actuellement pas consensus est le milieu de culture utilisé. En effet, certains auteurs préconisent de n'utiliser que des milieux de cultures riches (McTaggart *et al.*, 2018) tandis que d'autres assurent que le milieu utilisé n'a pas d'importance pourvu qu'il ait servi à l'élaboration de la base de données (Body *et al.*, 2018).

Dans cet article, nous nous proposons de comparer l'efficacité de la nouvelle base de données Vitek® MS IVD V3.0 ([Girard et al., 2017](#)), qui devrait permettre une identification fiable des *Nocardia*. Les expériences ont été réalisées à partir d'une collection de l'Observatoire Français des Nocardioses, soit 222 souches isolées chez des patients Français lors de l'année 2014, représentant 18 espèces de *Nocardia*. Nous nous sommes intéressés au milieu BCP, utilisé avec succès au sein de l'OFN mais ne faisant pas partie de ceux préconisés par le fournisseur du système Vitek® MS IVD V3.0, afin d'évaluer la possibilité qu'il donne des résultats comparables aux milieux de culture avec lesquels la base de données a été construite. Deux milieux de cultures COS (riche et ayant servi à la construction de la base de données) et BCP (pauvre mais qui permet la croissance rapide de *Nocardia* et qui n'a pas servi à la construction de la base de données) ont été comparés ainsi que différentes stratégies de dépôt. Cette étude permettra de vérifier si l'identification de *Nocardia* sans supplémentation de la base de données Vitek® MS IVD V3.0 est suffisamment fiable pour proposer le MALDI-ToF MS comme outil adéquat pour l'identification en routine de ce genre bactérien, ainsi que la possibilité d'utiliser un milieu de culture autre que celui préconisé par le constructeur. Tout l'enjeu ici est d'identifier de manière fiable, mais également le plus vite possible l'espèce impliquée dans la nocardiose afin d'administrer au patient un traitement bien ciblé à l'espèce.

Les résultats de cette partie ont été valorisés dans un article intitulé « Assessment of Vitek MS IVD database V3.0 for identification of French isolates of *Nocardia* spp. Using two different culture media and comparing direct smear and protein extraction procedures » publié dans la revue European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Ces expériences ont été menées en collaboration avec Thibaut Durand dans le cadre de son mémoire du diplôme d'études spécialisées en biologie médicale. Nous avons réalisé les expériences ensemble ainsi que le retraitement des données et de la rédaction de l'article.

## Article 3

# ASSESSMENT OF VITEK® MS IVD DATABASE V3.0 FOR IDENTIFICATION OF FRENCH ISOLATES OF *NOCARDIA* SPP. USING TWO DIFFERENT CULTURE MEDIA AND COMPARING DIRECT SMEAR AND PROTEIN EXTRACTION PROCEDURES

Durand T<sup>1</sup>, Vautrin F<sup>2</sup>, Bergeron E<sup>2</sup>, Girard V<sup>3</sup>, Polsinelli S<sup>3</sup>, Monnin V<sup>3</sup>, Durand G<sup>3</sup>, Dauwalder O<sup>1</sup>, Dumitrescu O<sup>1</sup>, Laurent F<sup>1</sup>, Rodríguez-Nava V<sup>1,2</sup>

1. Institut des Agents infectieux, Centre de Biologie et pathologies Nord, Hôpital de la Croix Rousse
2. UMR CNRS 5557, INRA 1418, VetAgro Sup, Ecologie Microbienne, Université Lyon-1, Lyon, France
3. bioMérieux France, Microbiologie R&D, La Balme-les-Grottes, France

***Publié dans European Journal of Clinical Microbiology  
& Infectious Diseases***

*in p*

[https://doi.org/ 10.1007/s10096-019-03758-x](https://doi.org/10.1007/s10096-019-03758-x)



*Assessment of VITEK® MS IVD database  
V3.0 for identification of Nocardia spp.  
using two culture media and comparing  
direct smear and protein extraction  
procedures*

**T. Durand, F. Vautrin, E. Bergeron,  
V. Girard, S. Polsinelli, V. Monnin,  
G. Durand, O. Dauwalder,  
O. Dumitrescu, F. Laurent, et al.**

**European Journal of Clinical  
Microbiology & Infectious Diseases**

ISSN 0934-9723

Eur J Clin Microbiol Infect Dis  
DOI 10.1007/s10096-019-03758-x



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".





## Assessment of VITEK® MS IVD database V3.0 for identification of *Nocardia* spp. using two culture media and comparing direct smear and protein extraction procedures

T. Durand<sup>1</sup> · F. Vautrin<sup>2</sup> · E. Bergeron<sup>2</sup> · V. Girard<sup>3</sup> · S. Polsinelli<sup>3</sup> · V. Monnin<sup>3</sup> · G. Durand<sup>3</sup> · O. Dauwalder<sup>1</sup> · O. Dumitrescu<sup>1</sup> · F. Laurent<sup>1</sup> · V. Rodríguez-Nava<sup>1,2</sup>

Received: 30 October 2019 / Accepted: 30 October 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

### Abstract

We assessed the performance of the VITEK® MS IVD V3.0 matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) V3.0 database for the identification of *Nocardia* spp. as compared with targeted DNA sequencing. A collection of 222 DNA sequence-defined *Nocardia* spp. strains encompassing 18 different species present or not in the database was tested. Bromocresol purple agar (BCP) and Columbia agar +5% sheep's blood (COS) culture media were used together with two different preparation steps: direct smear and a "3 attempts" procedure that covered (1) spotting of an extract, (2) new spotting of the same extract, and (3) spotting of a new extract. The direct smear protocol yielded low correct identification rates ( $\leq 15\%$  for both media) whereas protein extraction yielded correct identification results ( $> 67\%$  regardless of the media used.). The use of 2 additional attempts using repeat or new extracts increased correct identification rates to 87% and 91% for BCP and COS, respectively. When using the 3 attempts procedure, the best identification results, independent of media types, were obtained for *N. farcinica* and *N. cyriacigeorgica* (100%). Identification attempts 2 and 3 allowed to increase the number of correct identifications (BCP, +20%; COS, +13%). The enhancement in performance during attempts 2 and 3 was remarkable for *N. abscessus* (81% for both media) and low prevalence species (BCP, 70%; COS, 85%). Up to 3.4% and 2.4% of the strains belonging to species present in the database were misidentified with BCP and COS media, respectively. In 1.9% of the cases for BCP and 1.4% for COS, these misidentifications concerned a species belonging to the same phylogenetic complex. Concerning strains that are not claimed in the V3.0 database, *N. puris* and *N. goodfellowi* generated "No identification" results and 100% of the strains belonging to *N. arthritidis*, *N. cerraensis*, and *N. altamirensis* yielded a misidentification within the same phylogenetic complex. Vitek® MS IVD V3.0 is an accurate and useful tool for identification of *Nocardia* spp.

**Keywords** *Nocardia* spp. · MALDI-ToF · BCP · COS · DNA sequencing

### Introduction

*Nocardia* species are filamentous, Gram-positive bacteria belonging to the order *Corynebacteriales*. More than 100

*Nocardia* species have been characterized, among which approximately half are of medical importance [1]. Members of this genus are cosmopolitan and ubiquitous in the environment. Nocardiosis is primarily opportunistic and affects immunocompromised patients mostly [2, 3], although immunocompetent patients can also be affected [4]. Although cutaneous and soft tissue infections predominate, the most common presentation is pulmonary nocardiosis [5–7]. The mortality associated with these infections remains high [8], which underlines the need for rapid and effective treatment. Intrinsic antimicrobial susceptibility patterns differ between species [9] and render rapid identification of the species essential. Currently, *Nocardia* spp. identification is based on 16S rRNA, *hsp65*, *secA1*, *rpoB*, and *gyrB* gene sequencing [10–12]. Although these techniques are specific and sensitive,

✉ V. Rodríguez-Nava  
veronica.rodriguez-nava@univ-lyon1.fr

<sup>1</sup> Institut des Agents infectieux, Centre de Biologie et Pathologies Nord, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon, France

<sup>2</sup> UMR CNRS 5557, Ecologie Microbienne – Groupe de Recherche "Pathogènes Opportunistes et Environnement" – ISPB-Faculté de Pharmacie, Université Lyon 1, Lyon, France

<sup>3</sup> bioMérieux France, Microbiology R&D, La Balme-les-Grottes, France



their drawbacks include costs, duration, and limited availability. Thus, samples must often be transported, delaying the identification of the pathogen. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS), a tool that is now widely used to identify common bacterial and yeast species, is a promising technology for *Nocardia* spp. identification. It is easy to use, fast, and cost-effective and, hence, an interesting alternative to molecular methods. The Bruker BioTyper system has been evaluated for clinical *Nocardia* spp. identification [11, 13–15] as was the VITEK® MS IVD system [16–18].

Our objective was to evaluate the performance of the VITEK® MS IVD V3.0 database for the identification of *Nocardia* spp. strains and different strategies for the specimen preparation step were assessed. In parallel, the performance of bromocresol purple agar (BCP) was compared with those obtained on Columbia agar +5% sheep's blood (COS).

## Materials and methods

### Bacterial strains

The collection of isolates used in this study was from the Observatoire Français des Nocardioses (OFN), Lyon, France. This collection is composed of 222 strains with 131 isolates specifically collected in 2014 from the OFN, Institut des Agents Infectieux (French epidemiology, [19]). In addition, for each species tested, we have included the corresponding type strain (Table 1). All isolates were previously identified at species level by sequencing the 16S rRNA gene [20], and DNA sequencing was performed by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). When identification was not possible, a 441-bp fragment of the *hsp65* gene was amplified and sequenced [20]. The sequences were analyzed by BLAST (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) following the identification criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, [21]). Isolates were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and were subcultured on two different media (bromocresol purple agar (BCP, bioMérieux Ref. 43021) and Columbia agar +5% sheep's blood (COS, bioMérieux Ref. 43041) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 72 h. BCP is a poor culture medium not used to build the MS database but successfully used in OFN as it shows rapid growth for all *Nocardia* spp. In contrast, COS is a rich culture medium which has been used to build MS database and is recommended by the manufacturer.

### Protein extraction

All isolates were extracted according to the bioMérieux recommendations using the VITEK® MS IVD *Mycobacterium/Nocardia* kit (bioMérieux Ref. 415659). A 1  $\mu\text{L}$  loop full of organisms was transferred into a 1.5mL Eppendorf tube

containing 500  $\mu\text{L}$  of 70% ethanol and approximately 200  $\mu\text{L}$  of 0.5-mm glass beads. The mixture was vortexed for 15 min with a Genie 2 Vortex with a 13000-V1-24 Vortex adaptor (MoBio, Qiagen) and then was incubated at room temperature for 10 min. The suspension was briefly vortexed and then transferred into an empty 1.5mL Eppendorf tube (avoiding the transfer of any glass beads) and centrifuged for 2 min at 14,000 rpm. The ethanol supernatant was removed, and the pellet was re-suspended in 10  $\mu\text{L}$  of 70% formic acid. The tube was briefly vortexed, 10  $\mu\text{L}$  of acetonitrile was added, and the tube was vortexed again and then centrifuged for 2 min at 14,000 rpm. The resulting supernatant was used for analysis by MALDI-ToF MS.

### Sample deposits

For the two media types, the isolates were deposited in two different ways: (i) a direct smear by which a loop full of bacteria was directly applied as a thin film on a spot of a target slide (disposable 48 well stainless steel target slides, bioMérieux Vitek MS), (ii) an extract deposit by which 1  $\mu\text{L}$  of supernatant was deposited on a spot of a target slide as described above. In either case, the deposit was allowed to dry. Next, the deposit was overlaid with 1  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix solution and was allowed to dry again. The *Escherichia coli* reference strain ATCC 8739 was used on each plate for instrument calibration according to the manufacturer's instructions. Positive-control organism *N. farcinica* type strain (DSM 43665<sup>T</sup>) was spotted on the slide using the protocols described in this study. Finally, the slide was loaded into the VITEK® MS instrument.

### Sample analysis

All isolates were analyzed using the manufacturer's recommended settings, and the mass spectra obtained were compared with the V3.0 database. An identification associated with a confidence level was produced by the Myla software.

### Identification procedures

As seen above, two different preparation steps were tested. The results of each method were compared and the one yielding to better correct identification rates underwent a several attempts procedure in order to succeed in identifying strains for which a "no identification" result was obtained. In the case direct smear yielded the best results, 2 new deposits were foreseen. For preparation steps based on protein extraction, two new attempts were planned as follows: (i) new spotting of the same extract previously defrosted, and (ii) spotting of a new extract (Fig. 1).

**Table 1** Species and number of strains for each one, used in this study. Prevalence classification is done according to Lebeaux et al. (19)

Species	Number of strains including type strain	Type strain code
High prevalence	110	
<i>N. farcinica</i>	43	DSM 43665 <sup>T</sup>
<i>N. nova</i>	26	DSM 43256 <sup>T</sup>
<i>N. abscessus</i>	21	DSM 44432 <sup>T</sup>
<i>N. cyriacigeorgica</i>	19	DSM 44484 <sup>T</sup>
Intermediate prevalence	55	
<i>N. wallacei</i>	16	DSM 45136 <sup>T</sup>
<i>N. veterana</i>	14	DSM 44445 <sup>T</sup>
<i>N. otitidiscaviarum</i>	13	DSM 43242 <sup>T</sup>
<i>N. brasiliensis</i>	11	DSM 43758 <sup>T</sup>
Low prevalence	40	
<i>N. beijingensis</i>	12	DSM 44636 <sup>T</sup>
<i>N. paucivorans</i>	11	DSM 44386 <sup>T</sup>
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	10	DSM 44290 <sup>T</sup>
<i>N. neocaledoniensis</i>	3	DSM 44717 <sup>T</sup>
<i>N. asteroides</i>	4	DSM 43757 <sup>T</sup>
Sub-total	203	
<i>N. cerradoensis</i> *	3	DSM 44546 <sup>T</sup>
<i>N. altamirensis</i> *	2	DSM 44997 <sup>T</sup>
<i>N. puris</i> *	6	DSM 44599 <sup>T</sup>
<i>N. goodfellowi</i> *	3	DSM 45516 <sup>T</sup>
<i>N. arthritidis</i> *	5	DSM 44731 <sup>T</sup>
Total	222	

\*Low prevalence species that are not present in the V3.0 database

### Identification criteria

The result was considered correct at the species level if a single species identification associated with a confidence level > 99% was obtained and matched the identification obtained by the reference method (16S rRNA/*hsp65* sequencing). The identification was considered correct at complex level if the system yielded a slash line result (i.e. *Species 1/Species 2*) suggesting two *Nocardia* species, one matching with the one obtained by the reference method and if the other one belonged to the same phylogenetic complex according to McTaggart et al. [12].

### Results

#### Performance for species present in the VITEK MS V3.0 database

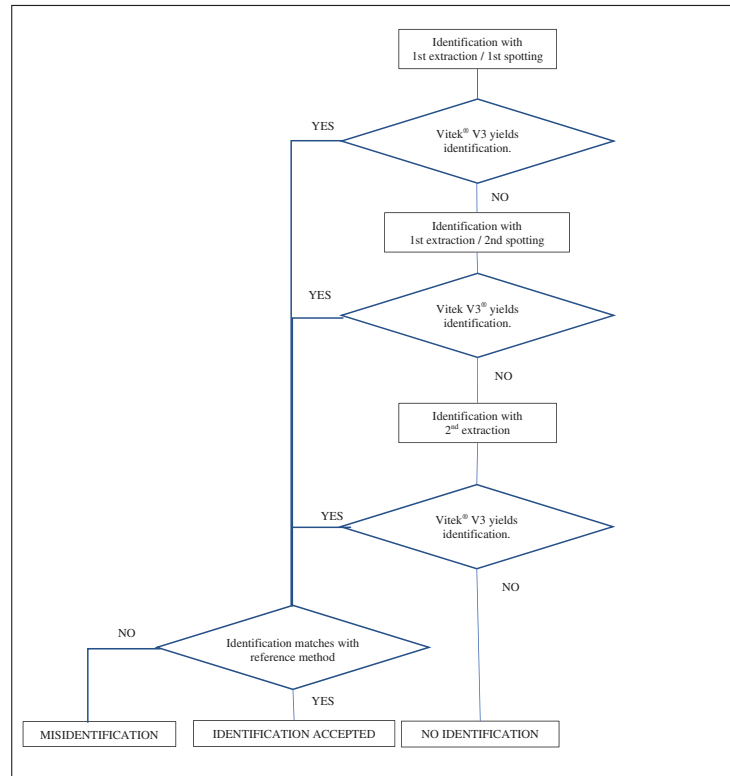
Out of 222 tested strains, 203 belonged to species present in the VITEK MS V3.0 database and were first submitted to a standard smear based identification process. The system yielded poor identification rates of 15% and 11% for BCP and COS media, respectively. The protein extraction procedure allowed better results as the system yielded correct

identification for 67% of isolates from the BCP medium and 78% from the COS medium. Taking into account these results, the preparation step based on protein extraction was the one that underwent two more attempts (herein, “attempt 2” and “attempt 3”) in order to increase correct identification rates.

Spotting of the same extract after defrosting (attempt 2) for previously unidentified isolates (68 for BCP and 45 for COS media) allowed to increase correct identification rates, 24/68 (35%) for BCP medium and 15/45 (33%) for COS medium (Table 2). Spotting of a new extract (attempt 3) for unidentified isolates in attempt 2 (44 strains for BCP and 30 for COS media) further helped to increase correct identification rates, 18/44 strains (41%) for BCP medium and 11/30 strains (37%) for COS medium. So, thanks to the second and third attempts, more than a half of the strains not identified in the first attempt were identified as follows: 42/68 (62%) with BCP medium and 26/45 (58%) with COS. Overall, we reached correct identification at species or complex level at 87% (an increment of 20%) for the BCP medium and at 91% (an increment of 13%) for the COS medium (Table 2).

For the most prevalent species (*N. farcinica*, *N. nova*, *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*), which account for 54% of all tested strains, high identification rates were obtained: up to 93% (101/109) and 94% (102/109) for BCP and COS agar, respectively. Again, attempts 2 and 3 lead to a considerable increase of correct identification rates regarding those of

Fig. 1 Decision algorithm



attempt 1 (+21% for BCP and +10% for COS). *N. farcinica* and *N. cyriacigeorgica* were 100% correctly identified, mostly in the first attempt. Regarding *N. nova*, more than 80% of the strains were identified at complex level and displayed as a slash line “*N. nova* 50%/*N. africana* 50%”. For this species and particularly on BCP medium, the last two attempts increased the number of correct identifications by 23% and for COS medium almost all the correct identifications (85%) were obtained upon first spotting. Regarding the *N. abscessus* strains, Vitek® MS IVD V3.0 yielded a correct identification from the first spot in half of the cases. Attempts 2 and 3 allowed to increase the overall correct identification rates (BCP +29%, COS +24%).

Concerning the species with intermediate prevalence (*N. wallacei*, *N. brasiliensis*, *N. veterana*, *N. otitidiscaviarum*), attempts 2 and 3, allowed to increase the correct identification rates (+15% for both media) for reaching a high cumulative identification rate of 89% (48/54) of isolates for both media. However, there were slightly lower correct identification rates for *N. veterana* compared with the 3 other species of this group (Table 2).

For species with low prevalence (*N. paucivorans*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. asteroides sensu stricto*, *N. beijingensis*, *N. neocaledoniensis*), the cumulative

identification rates were satisfactory. Up to 70% (28/40) of isolates were identified using the BCP medium and 85% (34/40) with the COS medium. For reaching these values, attempts 2 and 3 were helpful (BCP +27%, COS +20%). The full identification procedure for *N. paucivorans* and *N. pseudobrasiliensis* allowed to identify 82% (9/11) and 70% (7/10) of the strains for BCP medium and 100% of the strains for COS medium. For *N. beijingensis*, only 67% (8/12) with the “3 attempts” procedure of isolates were correctly identified with both media. The 3 isolates of *N. neocaledoniensis* were correctly identified regardless of the medium. Regarding the 4 strains of *N. asteroides stricto sensu*, only one of them was correctly identified at species level using both media. In addition, a correct identification at complex level under the form “*N. asteroides/N. neocaledoniensis*” was obtained only for one strain for COS medium.

Regarding misidentification of strains belonging to species present in the manufacturer’s database, 3.4% of the isolates were misidentified with BCP (7/203) and 2.4% with COS (5/203) media types (Table 3). One strain of *N. nova* was identified as *N. veterana* with both media. One strain of *N. abscessus* was identified as *N. veterana* and another one was identified as *N. beijingensis* with both media. One strain of *N. veterana* was identified as *N. cyriacigeorgica* with both media, too. One strain of *N. pseudobrasiliensis* was identified

**Table 2** Number of correctly identified isolates from the subset of species present in the V3.0 database (“% initial” stands for the percentage of correct identifications regarding the initial number of strains; “% attempt” stands for the percentage of correct identifications regarding the number of strains used exclusively in this attempt)

Species	Attempt 1: spotting of an extract			Attempt 2: new deposit of the same extract			Attempt 3: deposit of a new extract			Cumulative total	
	Initial no. of isolates	BCP (% initial)	COS (% initial)	No. of isolates (BCP/COS)	BCP (% attempt) (% initial)	COS (% attempt) (% initial)	No. of isolates (BCP/COS)	BCP (% attempt) (% initial)	COS (% attempt) (% initial)	BCP (% initial)	COS (% initial)
High prevalence	109	78 (72)	92 (84)	31/17	14 (45)(13)	6 (35)(6)	17/11	9 (53)(8)	4 (36)(4)	101 (93)	102(94)
<i>N. farcinica</i>	43	33 (77)	41 (95)	10/2	8 (80)(19)	1 (50)(2)	2/1	2 (100)(5)	1 (100)(2)	43 (100)	43 (100)
<i>N. nova</i>	26	16 (62)	22 (85)	10/4	3 (30)(12)	1 (25)(4)	7/3	3 (43)(12)	0 (0)(0)	22 (85) <sup>1</sup>	23 (88) <sup>1</sup>
<i>N. abscessus</i>	21	11 (52)	12 (57)	10/9	3 (30)(14)	3 (33)(14)	7/6	3 (43)(14)	2 (33)(10)	17 (81)	17 (81)
<i>N. cyrtaceigeorgica</i>	19	18 (95)	17 (89)	1/2	0 (0)(0)	1 (50)(5)	1/1	1 (100)(5)	1 (100)(5)	19 (100)	19 (100)
Intermediate prevalence	54	40 (74)	40 (74)	14/14	5 (36)(9)	4 (29)(7)	9/10	3 (33)(6)	4 (40)(7)	48 (89)	48 (89)
<i>N. wallacei</i>	16	12 (75)	10 (63)	4/6	2 (50)(13)	2 (33)(13)	2/4	1 (50)(6)	3 (75)(19)	15 (94)	15 (94)
<i>N. veterana</i>	14	11 (79)	10 (71)	3/4	0 (0)(0)	1 (25)(7)	3/3	0 (0)(0)	0 (0)(0)	11 (79)	11 (79)
<i>N. otitidiscaviarum</i>	13	8 (62)	11 (85)	5/2	2 (40)(15)	0 (0)(0)	3/2	2 (67)(15)	1 (50)(8)	12 (92)	12 (92)
<i>N. brasiliensis</i>	11	9 (82)	9 (82)	2/2	1 (50)(9)	1 (50)(9)	1/1	0 (0)(0)	0 (0)(0)	10 (91)	10 (91)
Low prevalence	40	17 (43)	26 (65)	23/14	5 (22)(13)	5 (36)(13)	18/9	6 (33)(15)	3 (33)(8)	28 (70)	34 (85)
<i>N. beijingensis</i>	12	5 (42)	6 (50)	7/6	2 (29)(17)	1 (17)(8)	5/5	1 (20)(8)	1 (20)(8)	8 (67)	8 (67)
<i>N. paucivorans</i>	11	4 (36)	9 (82)	7/2	2 (29)(18)	2 (100)(18)	5/0	3 (60)(27)	-	9 (82)	11 (100)
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	10	5 (50)	6 (60)	5/4	0 (0)(0)	2 (50)(20)	5/2	2 (40)(20)	2 (100)(20)	7 (70)	10 (100)
<i>N. neocaledoniensis</i>	3	2 (67)	3 (100)	1/0	1 (100)(33)	-	0/0	-	-	3 (100)	3 (100)
<i>N. asteroides</i>	4	1 (25)	2 (50)	3/2	0 (0)(0)	0 (0)(0)	3/2	0 (0)(0)	0 (0)(0)	1 (25)	2 (50) <sup>2</sup>
Total	203	135 (67)	158 (78)	68/45	24 (35)(12)	15 (33)(7)	44/30	18 (41)(9)	11 (37)(5)	177 (87)	184 (91)

<sup>1</sup> *N. nova* was identified using slash line *N. nova/N. africana*<sup>2</sup> One *N. asteroides* strain was identified using slash line *N. asteroides/N. neocaledoniensis*

as *Pseudomonas oryzae* with BCP medium but a correct identification with COS medium was obtained. A re-extraction of the strain yielded the correct identification, so contamination is plausible, which in the end was not possible to verify. One strain of *N. asteroides sensu stricto* was identified as *N. neocaledoniensis* with BCP medium. However, a correct identification at complex level was obtained with COS medium and a second strain of *N. asteroides sensu stricto* was identified as *N. neocaledoniensis* with both media.

### Performance for species absent from the VITEK MS V3.0 database

Regarding the 19 strains belonging to 5 species absent from the V3.0 database (*N. altamirensis*, *N. arthritidis*, *N. cerraodoensis*, *N. goodfellowi*, *N. puris*), they were either not identified or misidentified. All the strains of *N. goodfellowi* and *N. puris* (including their type strains) yielded no identification. For the remaining 10 strains, misidentifications were obtained. Up to 4/5 isolates of *N. arthritidis* were identified as *N. abscessus*. One isolate was identified as *N. beijingensis* with BCP but no identification could be obtained with COS. The 3 isolates of *N. cerraodoensis* were identified as *N. nova* 50%/ *N. africana* 50%, and both strains of *N. altamirensis* were identified as *N. brasiliensis*.

### Discussion

In this study, the direct smear preparation step was evaluated for the first time with the Vitek® MS IVD and was found not satisfactory. We demonstrated in this study that for VITEK® MS IVD V3.0, an extraction is needed to obtain good identification rates for *Nocardia* spp. New attempts were needed as 67% and 78% of the strains were identified during the first spotting of the first extract with BCP and COS media, respectively. The necessity of repeating identification procedure by different means with this system has also been observed by Body et al. [18] who needed to repeat identification procedures for 33% of their *Nocardia* spp. strains. This study shows that the “3 attempts” procedure with both media lead to final identification rates (BCP 87%, COS 91%) which match with those of Body et al (90%) [18].

Different preparation steps are referred in the literature for other MALDI-ToF MS-based systems that may be worth testing with VITEK® MS IVD V3.0. For example, for Microflex LT, some recent studies suggest a halfway technique between direct smear and extraction: the direct on-target extraction [22]. Further studies should be done for VITEK® MS IVD V3.0 to assess identification accuracy when using this kind of a more rapid preparation step.

The impact of the culture medium and incubation time on the quality of the spectra has already been discussed [18, 23, 24, 25]; however, conclusions are contradictory. Khot et al. [24] and McTaggart et al. [25] show that the incubation time impacts the quality of the spectra since better results were obtained with a short incubation time. Moreover, McTaggart et al. [25] concluded that the type of culture medium used has an indirect impact since rich media, such as COS, allow faster and more abundant growth which can result in spectra of better quality. However, according to Body et al. [18], identification results can be identical independently of the culture medium but their study was limited to media used for the building of the database.

Our results agree with McTaggart et al. [25] as we observed slightly better correct identification rates with a rich medium like COS (91%) compared with a poor one like BCP (87%) which nevertheless gave good results. However, we demonstrate the possibility to use a medium like BCP for identification purpose even if it has not been used to build the database. Cumulative results are indeed comparable with those of COS medium and especially for highly and intermediate prevalence species.

For *N. nova* strains for which VITEK® MS IVD V3.0 yielded a correct identification (85% BCP; 88% COS), only a complex level result displayed as “*N. nova* 50% / *N. africana* 50%” could be obtained. As explained by Girard et al. [16], the *N. nova* and *N. africana* species are currently indistinguishable by the VITEK® MS IVD V3.0 and are therefore only identified at the complex level. In fact, the taxonomy of the genus *Nocardia* spp. has evolved considerably in recent years and in addition to *N. nova* and *N. africana*, more species have been added to the *N. nova* complex including *N. veterana*, *N. cerraodoensis*, *N. kruczakiae*, *N. aobensis*, *N. mikamii*, and *N. elegans* [12, 26]. Hence, some of the observed misidentifications (1 out of the 26 tested strains of *N. nova* was identified as *N. veterana* and all the 3 strains of *N. cerraodoensis* as *N. nova*/*N. africana*) remain understandable. In a similar way, the *N. abscessus* is very close to other species such as *N. beijingensis*, *N. arthritidis*, and *N. asiatica* forming a phylogenetic clade [1, 12, 26]. On the 7 misidentifications obtained for those species, 6 of them were obtained within the complex. For example, *N. arthritidis* strains were misidentified as *N. abscessus* or *N. beijingensis*. Even if *N. arthritidis* is not present in the database, the result yielded by VITEK® MS IVD V3.0 remained inside the correct phylogenetic complex. Body et al. [18] observed several similar misidentifications.

Some other misidentifications yielded by the system are also understandable. For example, *N. altamirensis* is misidentified as *N. brasiliensis*. These two species belong to the same phylogenetic clade which also encompasses *N. boironii* and *N. vulneris* [27]. In the same way, we observed a misidentification of a *N. asteroides* strain as

**Table 3** Misidentifications obtained with Vitek® MS IVD V3.0 and two different media for tested *Nocardia* strains compared with the identification at species level obtained with the reference method. *BCP*, bromocresol purple agar; *COS*, Columbia agar +5% sheep's blood

Species <sup>1</sup>	Initial number of strains for this species	Identification by the Vitek® MS IVD	
		Medium	
		BCP	COS
<i>N. nova</i>	26	<i>N. veterana</i>	<i>N. veterana</i>
<i>N. abscessus</i>	21	<i>N. veterana</i>	<i>N. veterana</i>
<i>N. abscessus</i>		<i>N. beijingensis</i>	<i>N. beijingensis</i>
<i>N. veterana</i>	14	<i>N. cyriacigeorgica</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	10	<i>Pseudomonas oryziabittans</i>	Correct Id
<i>N. asteroides</i>	4	<i>N. neocaledoniensis</i>	Correct Id
			(complex: <i>N. asteroides</i> / <i>N. neocaledoniensis</i> )
<i>N. asteroides</i>		<i>N. neocaledoniensis</i>	<i>N. neocaledoniensis</i>
<i>N. arthritidis</i> *	5	<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. arthritidis</i> *		<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. arthritidis</i> *		<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. arthritidis</i> *		<i>N. beijingensis</i>	No Id
<i>N. arthritidis</i> <sup>T*</sup>		<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. cerradoensis</i> *	3	<i>N. nova</i> 50%/ <i>N. africana</i> 50%	<i>N. nova</i> 50%/ <i>N. africana</i> 50%
<i>N. cerradoensis</i> *		<i>N. nova</i> 50%/ <i>N. africana</i> 50%	<i>N. nova</i> 50%/ <i>N. africana</i> 50%
<i>N. cerradoensis</i> <sup>T*</sup>		<i>N. nova</i> 50%/ <i>N. africana</i> 50%	<i>N. nova</i> 50%/ <i>N. africana</i> 50%
<i>N. altamirensis</i> *	2	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
<i>N. altamirensis</i> <sup>T*</sup>		<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>

<sup>1</sup> Species identification based in reference method

\*Species that are not present in the V3.0 database

*N. neocaledoniensis*, which is clustered in the same phylogenetic complex. This misidentification was also observed by Body et al. [18] for 3/19 of their *N. asteroides* isolates. Misidentifications regarding low prevalence species can be related to the availability of low numbers of spectra for these species [17].

Nowadays, MALDI ToF MS seems not to have sufficient discriminatory power to distinguish all species belonging to the different phylogenetic clades. Some species misidentifications are problematic as such species do not always present the same antibiotic profiles, potentially leading to inappropriate patient handling. This is especially true for the *N. abscessus* complex, since *N. beijingensis* and *N. asiatica* are usually susceptible to imipenem ([28] and personal data) in contrast to *N. abscessus* and *N. arthritidis* ([29] and personal data) which are generally resistant. This divergence of antibiotic profiles can also be observed inside the *N. brasiliensis* complex. For the *N. nova* complex, misidentifications have a

lesser clinical impact as the species in this complex show similar antibiotic profiles but the prevalence of these species are different and this can lead to wrongly inferred epidemiological scenarios. In the case of *N. asteroides* and *N. neocaledoniensis*, an accurate identification at species level is not essential, as they are species rarely found in clinical specimens and their susceptibility patterns are not clearly defined.

We suggest that when a species belonging to *N. nova*, *N. abscessus*, *N. brasiliensis*, or *N. asteroides* complexes is detected, VITEK® MS IVD V3.0 results in identification at the complex level only. In order to avoid therapeutic errors, this kind of result should lead to thorough antibiotic susceptibility testing to help choose appropriate treatment.

Some limitations must be taken into account. Regarding the methodology, new spotting of the same extract was not done immediately after the first spotting as the extract was meanwhile frozen. This can be considered a deviation in



routine laboratory procedure. It is possible that freezing may cause weakening of the bacterial cell walls. Also, the reproducibility of the method was not evaluated. Additional tests are necessary in order to have a better appreciation of the accuracy of these techniques.

VITEK® MS IVD V3.0 yielded good identification rates for *Nocardia* spp. at the species and complex level. Regarding routine processing of *Nocardia* specimens in routine laboratories, extraction gives results above 67% in terms of correct identification rates. In case of “no identification,” additional deposit of the same extract or deposit of a new extract can help in obtaining identification rates above 87%. BCP culture medium, which was not used during database development, yields similar identifications as compared with the medium that was used for database development. The best way of avoiding misidentification of low prevalence species is to supplement the database with more strains for these species. Our data show that the VITEK® MS IVD V3.0 can be considered as a useful tool in routine laboratories working with *Nocardia* spp.

**Funding information** Florian VAUTRIN held a doctoral fellowship from the Region Auvergne-Rhône-Alpes. This study was funded by the VITEK® MS manufacturer (bioMérieux, R&D Microbiologie, La Balme-Les-Grottes, France).

### Compliance with ethical standards

**Disclaimer** The data analysis described here was performed without direct commercial influence by the device manufacturer.

### References

- Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM (2017) The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification. *J Clin Microbiol* 56:e01419–e01417. <https://doi.org/10.1128/JCM.01419-17>
- Haussaire D, Fournier P-E, Djigouba K, Moal V, Legris T, Purgus R, Bismuth J, Elharrar X, Reynaud-Gaubert M, Vacher-Coponat H (2017) Nocardiosis in the south of France over a 10-years period, 2004–2014. *Int J Infect Dis* 57:13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.005>
- Le Coustumier EM, Denes E, Martin C, Weinbreck P (2017) Nocardiose : analyse rétrospective d’une série de 19 cas. *Rev Médecine Interne* 38:81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.005>
- Wilson JW (2012) Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo Clin Proc* 87:403–407. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.11.016>
- Anagnostou T, Arvanitis M, Kourkoumpetis TK, Desalermos A, Carneiro HA, Mylonakis E (2014) Nocardiosis of the central nervous system: experience from a general hospital and review of 84 cases from the literature. *Medicine (Baltimore)* 93:19–32. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000012>
- Jiang Y, Huang A, Fang Q (2016) Disseminated nocardiosis caused by *Nocardia otitidiscaviarum* in an immunocompetent host: a case report and literature review. *Exp Ther Med* 12:3339–3346. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3755>
- Liu WL, Lai CC, Ko WC, Chen YH, Tang HJ, Huang YL, Huang YT, Hsueh PR (2011) Clinical and microbiological characteristics of infections caused by various *Nocardia* species in Taiwan: a multicenter study from 1998 to 2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:1341–1347. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1227-9>
- Munoz J, Mirelis B, Aragon LM, Gutierrez N, Sanchez F, Espanol M, Esparcia O, Gurgui M, Domingo P, Coll P (2007) Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997–2003. *J Med Microbiol* 56:545–550. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46774-0>
- Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Navarro AM, Saéz-Nieto JA (2017) Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain. *J Antimicrob Chemother* 1:754–761. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw489>
- Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ (2006) Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 19:259–282. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.259-282.2006>
- Xiao M, Pang L, Chen SC-A, Fan X, Zhang L, Li H-X, Hou X, Cheng J-W, Kong F, Zhao Y-P (2016) Accurate identification of common pathogenic *Nocardia* species: evaluation of a multilocus sequence analysis platform and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *PLOS ONE* 11(1):e0147487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147487>
- McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX (2010) Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 48:4525–4533. <https://doi.org/10.1128/JCM.00883-10>
- Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, Lucas BC, Rodning AA, Walchak RC, Deml SM, Wohlfel SL, Wengenack NL (2016) Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of mycobacterium species, *Nocardia* species, and other aerobic actinomycetes. *J Clin Microbiol* 54:376–384. <https://doi.org/10.1128/JCM.02128-15>
- Segawa S, Nishimura M, Sogawa K, Tsuchida S, Murata S, Watanabe M, Matsushita K, Kamei K, Nomura F (2015) Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Clin Proteomics* 12:6. <https://doi.org/10.1186/s12014-015-9078-5>
- Marin M, Ruiz A, Iglesias C, Quiroga L, Cercenado E, Martín-Rabadán P, Bouza E, Rodríguez-Sánchez B (2018) Identification of *Nocardia* species from clinical isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 24(12):1342.e5–1342.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.014>
- Girard V, Mailler S, Welker M, Arsac M, Cellière B, Cotte-Pattat P-J, Chatellier S, Durand G, Béni AM, Schrenzel J, Miller E, Dussoulier R, Dunne WM Jr, Butler-Wu S, Saubolle MA, Sussland D, Bell M, van Belkum A, Deol P (2016) Identification of *Mycobacterium* spp. and *Nocardia* spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Diagn Microbiol Infect Dis* 86:277–283. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.027>
- Girard V, Mailler S, Polsinelli S, Jacob D, Saccomani MC, Cellière B, Monnin V, van Belkum A, Hagen F, Meis JF, Durand G (2017) Routine identification of *Nocardia* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 87:7–10. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.09.024>
- Body BA, Beard MA, Slechta ES, Hanson KE, Barker AP, Babady NE, McMillen T, Tang YW, Brown-Elliott BA, Iakhiaeva E, Vasireddy R, Vasireddy S, Smith T, Wallace RJ Jr, Turner S, Curtis L, Butler-Wu S, Rychert J (2018) Evaluation of the Vitek MS v3.0 matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Mycobacterium* and *Nocardia* species. *J Clin Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00237-18>



19. Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, Djadi-Prat J, Mouniée D, Boiron P, Lortholary O, Rodriguez-Nava V (2019) Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010-2015. Clin Microbiol Infect 25:489–495. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.013>
20. Rodriguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois J-P, Boiron P, Laurent F (2006) Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for hsp65 gene-based identification of *Nocardia* species. J Clin Microbiol 44:536–546
21. CLSI (2008) MM18-A: interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing, 1st edn. CLSI, Wayne
22. Yarbrough ML, Lainhart W, Burnham C-AD (2017) Identification of *Nocardia*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* using MALDI-TOF MS with the Bruker Biotyper. Diagn Microbiol Infect Dis 89:92–97. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.019>
23. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T-D, Wauters G, Glupczynski Y (2010) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. J Clin Microbiol 48:4015–4021. <https://doi.org/10.1128/JCM.01234-10>
24. Khot PD, Bird BA, Durrant RJ, Fisher MA (2015) Identification of *Nocardia* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Land GA,   diteur. J Clin Microbiol 53:3366–3369. <https://doi.org/10.1128/JCM.00780-15>
25. McTaggart LR, Chen Y, Poopalrajah R, Kus JV (2018) Incubation time and culture media impact success of identification of *Nocardia* spp. by MALDI-ToF mass spectrometry. Diagn Microbiol Infect Dis 92:270–274. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.016>
26. Tamura T, Ohji S, Ichikawa N, Hosoyama A, Yamazoe A, Hamada M et al (2018) Reclassification of *Nocardia* species based on whole genome sequence and associated phenotypic data. J Antibiot (Tokyo) 71:633–641
27. Gilquin JM, Riviere B, Jurado V, Audouy B, Kouatche JB, Bergeron E, Mouniée D, Molina T, Faure P, Saiz-Jimenez C, Rodriguez-Nava V (2016) First case of actinomycetoma in France due to a novel *Nocardia* species, *Nocardia boironii* sp. nov. mSphere 1(6). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00309-16>
28. Iona E, Giannoni F, Brunori L, de Gennaro M, Mattei R, Fattorini L (2007) Isolation of *Nocardia asiatica* from cutaneous ulcers of a human immunodeficiency virus-infected patient in Italy. J Clin Microbiol 45:2088–2089. <https://doi.org/10.1128/JCM.00263-07>
29. Brown-Elliott BA, Killingley J, Vasireddy S, Bridge L, Wallace RJ Jr (2016) In vitro comparison of ertapenem, meropenem, and imipenem against isolates of rapidly growing *Mycobacteria* and *Nocardia* by use of broth microdilution and est. J Clin Microbiol 54:1586–1592. <https://doi.org/10.1128/JCM.00298-16>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



### Conclusions du chapitre 3

Ce chapitre démontre que l'identification des *Nocardia* par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF avec la base de données Vitek® MS IVD V3.0 après extraction des protéines membranaires et la démarche en « trois essais » est fiable pour les espèces de plus forte prévalence clinique, et ce quel que soit le milieu de culture utilisé. Pour les espèces de plus faible prévalence, la base de données Vitek® MS IVD V3.0 ne dispose pas de suffisamment de spectres voire pas du tout, pouvant entraîner une mauvaise identification ou tout simplement une non identification. Cette nouvelle base de données, bien qu'ayant été fortement incrémentée en espèces de *Nocardia*, nécessite encore l'ajout de plus de spectres de ce genre bactérien. Cette technologie ne permet pas non plus pour l'heure de discriminer certaines espèces et rend un résultat sous la forme de complexe. Par exemple, l'association *N. nova*/*N. africana*, qui peut amener à ce jour à créer des données épidémiologiques fausses compte tenu de la différence en clinique entre ces deux espèces (*N. nova* étant l'espèce la plus fréquente en clinique). En d'autres termes, il est plus probable que la souche étudiée soit *N. nova* plutôt que *N. africana*, qui n'a d'ailleurs jamais été retrouvée en Europe.

De même, les souches de l'espèce *N. arthritidis*, qui est absente de la base de données, ont été identifiées en tant que *N. abscessus* et *N. beijingensis*. En effet, le complexe *N. abscessus* contient les espèces *N. arthritidis*, *N. asiatica* et *N. beijingensis*. Pour contourner de mauvaises identifications qui pourraient donc survenir au sein de ce complexe, nous conseillons vivement la réalisation d'un antibiogramme car les espèces de ce complexe ont des profils de sensibilité aux antibiotiques variables.

Le point fort soulevé ici est que l'on peut utiliser le BCP comme milieu de culture même s'il n'a pas servi à construire la base de données. En effet, les taux d'identification correcte obtenus avec ce milieu sont comparables à ceux obtenus avec le milieu COS (ayant servi à construire la base de données).

Bien que la base de données ait été élaborée à partir de spectres obtenus par dépôt direct, nous n'avons obtenus des taux d'identification corrects que de 11 et 15 % pour les milieux BCP et COS respectivement à l'aide de cette méthode. La stratégie en « trois essais » (extraction, re-dépôt, nouvelle extraction) a donné des taux d'identification de 87 et 91 %. Nous recommandons donc l'étape préliminaire d'extraction des protéines avant le dépôt sur cible ainsi que la démarche en trois essais si nécessaire. Cette étape supplémentaire, bien qu'elle augmente le temps à consacrer à l'échantillon, augmente considérablement la probabilité d'obtenir une identification correcte.

En conclusion, le message de cet article qui s'adresse principalement aux biologistes est que le MALDI-ToF MS est une technologie fiable pour l'identification des *Nocardia* les plus impliquées en pathologie humaine. En revanche, une étape préliminaire d'extraction des protéines est indispensable pour obtenir de bons taux d'identification correcte et donc

pouvoir proposer rapidement un traitement adapté au patient. L'article propose également un arbre décisionnel qui permet de gérer au mieux l'identification de la bactérie après un premier résultat négatif, généralement par dépôt direct.

## **CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**



## **Discussion générale**

L'urbanisation est un phénomène apparu il y a une centaine d'années dans les pays industrialisés et s'observe actuellement partout autour du globe. En effet, la population en ville est passée de 13% en 1900 à plus de 50% en 2007, et jusqu'à plus de 70% dans les pays d'Europe et d'Amérique (OMS, 2010). L'explosion démographique et la tendance mondiale actuelle à l'urbanisation entraînent une forte pression foncière sur les écosystèmes urbains. L'étalement des villes se traduit notamment par une artificialisation et une imperméabilisation des surfaces, résultant en une perturbation du cycle de l'eau en ville. L'eau étant indispensable à la vie et à l'hygiène, elle est également un vecteur de nombreuses maladies infectieuses (Chen *et al.*, 2017). Il convient donc de la gérer de manière rigoureuse.

L'activité humaine génère de nombreux contaminants comme les hydrocarbures, les métaux lourds, les résidus pharmaceutiques ou encore les pesticides. Ces polluants sont souvent rejetés dans le milieu naturel et se confondent dans le cycle de l'eau (Pitt *et al.*, 1999). Afin de rétablir le cycle naturel de l'eau en ville, les eaux pluviales sont généralement infiltrées sur place à l'aide de bassins d'infiltration ou d'éléments paysagers adaptés à cette fonction (Azzout *et al.*, 1993). Ces aménagements, par leur fonction d'infiltration des eaux pluviales, concentrent de grandes quantités de granulats, poussières et particules présents sur les sols en ville. Cette accumulation de matière forme une couche de sédiments urbains riches en polluants chimiques mais également en microorganismes dont certains représentent un risque pour la santé humaine.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons évalué l'influence de l'anthropisation sur les communautés d'Actinobactéries avec un focus plus particulier sur le genre *Nocardia*, en prenant comme modèle d'étude un environnement anthropisé qu'est le bassin d'infiltration. Nous nous sommes intéressés à la corrélation entre les différents polluants présents dans les sédiments de ces structures et la biodiversité des espèces du genre *Nocardia*. En plus, nous avons cherché à établir des relations phylogénétiques entre des souches environnementales de l'espèce hautement pathogène *N. cyriacigeorgica* et des souches cliniques isolées chez des patients atteints de nocardiose afin de pouvoir déterminer ou non une possible origine environnementale lors de cas de nocardiose. Cette étude a également permis de comparer la virulence d'une souche environnementale vis-à-vis d'une souche pathogène de *N. cyriacigeorgica* sur modèle murin. Enfin, nous avons pu mettre en évidence les possibilités d'identification de *Nocardia* permises par la technologie du MALDI-ToF MS.

### **Diversité spatio-temporelle des Actinobactéries pathogènes**

A ce jour, peu d'informations relatives à la présence de microorganismes pathogènes dans les systèmes de traitement des eaux pluviales existent ainsi que sur leur habitat précis



(Almakki *et al.*, 2017). Cependant, certaines études ont démontré leur présence et leur capacité de survie dans des environnements pollués grâce à des propriétés hydrophobes (Khan *et al.*, 1997, Quatrini *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2017). Nous avons mesuré dans les sédiments urbains du bassin d'infiltration Django-Reinhardt des teneurs en HAP comparables à celles retrouvées dans des sols pollués d'une région industrielle chinoise (Li *et al.*, 2010) et constantes au cours du temps car en accord avec les valeurs retrouvées quelques années plus tôt dans le rapport Gessol (Winiarski *et al.*, 2015). Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons vu ces sédiments comme un milieu riche capable d'héberger des pathogènes grâce à leur capacité à accumuler des polluants pouvant être utilisés par des microorganismes comme source de carbone pour se développer. Nos travaux ont permis d'isoler lors des trois campagnes d'échantillonnage des souches de l'espèce pathogène *N. cyriacigeorgica*, indiquant une installation pérenne de la bactérie dans cette infrastructure. Lors de travaux préliminaires dans notre équipe de recherche, un isolat de *N. cyriacigeorgica* avait déjà été obtenu lors du premier échantillonnage en 2013 dans le bassin d'infiltration Django-Reinhardt (Stage Christophe Martin, 2013). Sébastien *et al.*, (2014) et Bernardin-Souibgui *et al.*, (2017a) ont également détecté par PCR la présence de cette bactérie dans le bassin de rétention, *i.e.* le compartiment en amont du bassin d'infiltration. En revanche, aucun travaux de physiopathologie n'avaient jusqu'alors été entrepris afin d'évaluer la virulence de telles souches environnementales et ainsi déterminer un éventuel risque microbiologique associé à la présence de cette espèce pathogène.

L'isolement de *N. cyriacigeorgica* dans les sédiments urbains d'un bassin d'infiltration renforce donc l'hypothèse qu'un des possibles réservoirs environnementaux de cette bactérie pathogène serait ceux fortement contaminés en hydrocarbures. Ce type d'environnement pourrait donc être une source de contamination pour les patients. En effet, d'autres travaux évoquent cette possibilité, notamment Arrache *et al.*, (2018) qui émettent l'hypothèse de l'origine environnementale d'une nocardiose cérébrale chez un patient pourtant immunocompétent mais qui travaillait dans un entrepôt de stockage d'une raffinerie. Freiberg *et al.*, (2019) expliquent quant à eux l'origine d'une nocardiose pulmonaire chez un patient par son travail dans un garage automobile où il aurait pu inhaler de la poussière contenant la bactérie. Ces deux environnements sont des milieux fortement pollués aux hydrocarbures.

Dans notre étude métataxonomique développée lors de ces travaux à partir du marqueur *hsp65* (Telenti *et al.*, 1991), nous avons constaté que des conditions d'humidité de 30-50% favorisent plutôt le développement d'espèces non pathogènes (*N. globerula*, *N. salmonicida*) tandis qu'une humidité très forte (supérieure à 110%) entraîne la présence d'espèces pathogènes telles que *N. abscessus* et *N. nova* et des conditions intermédiaires (50-80% d'humidité) permettent plutôt le développement de l'espèce *N. cyriacigeorgica*, que nous avons également retrouvée jusqu'à  $10^3$  UFC/g sédiments par méthode culturale, majoritairement lors de la période automnale. D'après Pujic *et al.*, (2015) et Lebeaux *et al.* (2018), ces trois dernières espèces font partie des plus retrouvées dans l'épidémiologie des nocardioses humaine. Il en découlerait donc un effet saisonnier dans l'abondance de certaines

espèces pathogènes. Cette hypothèse est confortée par des travaux menés sur *Legionella pneumophila* qui est plus abondante dans l'environnement en été (en se développant dans les systèmes de climatisation et les tours aéro-réfrigérantes) et dont le nombre de patients infectés augmente également durant la période estivale [Cilloniz et al., \(2017\)](#). Malheureusement, nous n'avons pas pu corréliser ces résultats à des données épidémiologiques afin de voir une éventuelle variabilité des espèces de *Nocardia* infectant les patients au cours de l'année et ainsi confirmer ou non notre hypothèse. Les mêmes questions se posent pour d'autres pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Aeromonas caviae* comme nous avons pu le voir avec les travaux de [Colin et al., \(2020\)](#) auxquels ces données métataxonomiques sont également rattachées. Enfin, le développement de cet outil d'analyse de métataxonomie à l'aide du marqueur *hsp65*, couplé à des analyses physico-chimiques effectuées sur les sédiments du bassin d'infiltration lors de nos campagnes d'échantillonnage, nous a permis d'évaluer l'influence de l'anthropisation sur les communautés bactériennes du sol. Nous avons pu démontrer ici que la pollution aux métaux lourds notamment, couplée à de fortes variations de température et d'humidité, permet une installation pérenne de plusieurs genres/espèces pathogènes d'Actinobactéries, dont les *Nocardia*.

### Phylogénie et physiopathologie de *N. cyriacigeorgica*

Durant des expériences exploratoires en 2013 ([Stage Christophe Martin, 2013](#)) et lors de ma thèse, plusieurs souches environnementales de l'espèce *N. cyriacigeorgica* ont été isolées pour la première fois en Europe à partir des sédiments urbains pollués d'un bassin d'infiltration de l'Est lyonnais (Django-Reinhardt, Chassieu). A l'aide des souches de *N. cyriacigeorgica* isolées lors de ces travaux de thèse, nous avons pu confirmer par une analyse multigénique (*rrs-hsp65-sodA-secA1*) la présence de trois phylogroupes au sein de cette espèce, comme démontré précédemment ([Schlaberg et al., 2008](#)). Cette méthodologie semble très intéressante pour l'identification car elle montre un polymorphisme important et cela permettrait d'aller au niveau du phylogroupe, et non plus de l'espèce, comme cela a été démontré dans ce travail. En termes de d'identification, cela est très intéressant pour détecter des phylogroupes très virulents (GUH-2) ou présentant des résistances particulières et ainsi mieux cibler la prise en charge de patients atteints des nocardioses. Ces clones environnementaux de *N. cyriacigeorgica* retrouvés dans le bassin d'infiltration avaient des liens clonaux avec des souches cliniques isolées de patients atteints de nocardioses pulmonaires, cérébrales ou cutanées. Ce lien avec un environnement pollué avait déjà été évoqué dans le cas d'une nocardiose pulmonaire qui a évolué en atteinte cérébrale chez un patient travaillant dans une raffinerie (environnement poussiéreux riche en hydrocarbures) mais n'avait pas pu être confirmé ([Arrache et al., 2018](#)).

A partir de l'analyse phylogénique du genre *N. cyriacigeorgica*, nous avons donc entrepris le séquençage d'un représentant de chaque phylogroupe de cette espèce afin d'évaluer la variabilité de la composition en gènes de virulence dans les génomes comme l'avait déjà fait [Zoropogui et al., \(2013\)](#) en comparant *N. cyriacigeorgica* avec *N. farcinica* et

*N. brasiliensis*. Après avoir mis en évidence une forte diversité infraspécifique au sein de cette espèce par l'analyse multigénique, nous n'avons à l'inverse pas observé de différence significative en terme de contenu de gènes de virulence entre la souche GUH-2 et la souche EML446, choisie comme la représentante des souches environnementales. Cependant, aucune de ces souches environnementales n'avaient été intégrées dans des expériences de physiopathologie sur modèle animal ou cellulaire, la plupart des études étant principalement réalisées à partir de la souche virulente de référence *N. cyriacigeorgica* GUH-2 (Beaman & Maslan, 1978). Ces deux souches ont donc été inoculées sur un modèle murin d'immunoparalysie transitoire à une dose infectante de  $10^6$  UFC/ souris. Une dangerosité supérieure de la souche GUH-2 a été observée par rapport à la souche EML446 car lors du suivi de la survie, une seconde vague de mortalité est apparue 25 jours après l'infection pour la souche clinique. De même, cette souche semble disséminer plus rapidement dans l'organisme que la souche environnementale, laissant supposer une adaptation à son hôte, expliquant son fort pouvoir pathogène. D'après la théorie du minimalisme de Moran *et al.*, (2002), une souche qui aura infecté un hôte perdra une partie de son génome et ainsi ses capacités de survie dans un environnement variable tel que le milieu extérieur, en accord avec la taille de génome inférieur de la souche GUH-2 par rapport à la souche EML446.

### Identification de *Nocardia* par MALDI-ToF MS

Enfin, dans cette dernière partie, nous nous sommes basés sur la technologie de spectrométrie de masse de type MALDI-ToF du constructeur bioMérieux. Bien que la base de données Vitek MS IVD V3.0 ait été construite à partir de spectres obtenus *via* des dépôts directs sur cible (Girard *et al.*, 2016), nous avons de très faibles résultats d'identification lors de l'utilisation de cette méthode de dépôts avec une identification correcte de l'ordre de 15%. Dans le cadre d'une étude sur l'identification de *Nocardia* à l'aide du système Microflex LT de Bruker, McTaggart *et al.*, (2018) recommandaient d'ailleurs une étape préliminaire d'extraction directement sur la cible.

Dans notre étude, nous avons donc surtout testé les performances du MALDI-ToF Vitek MS IVD couplé à sa nouvelle base de données V3.0 pour l'identification de *Nocardia* après une étape préliminaire d'extraction des protéines, réalisée en dehors de la cible de dépôt. Nous avons proposé une stratégie d'identification en trois temps avec un second dépôt, voire une seconde extraction, afin d'améliorer les taux d'identification dans 12 à 22% des cas en fonction du milieu de culture utilisé. Ces résultats sont comparables à ceux de Body *et al.*, (2018) qui avaient déjà évoqué l'utilité de la réalisation d'un second dépôt afin d'augmenter les taux d'identification.

Nous avons également fait le choix d'utiliser le milieu de culture riche COS largement utilisé dans les laboratoires de bactériologie et qui a servi à la réalisation de la base de données, mais aussi le milieu BCP moins répandu, mais qui permet tout de même une croissance rapide de la plupart des espèces de *Nocardia*. En effet, McTaggart *et al.*, (2018)

indiquaient que la nature du milieu de culture avait une influence sur la qualité des spectres obtenus et donc sur les résultats d'indentification. Les auteurs préconisaient de n'utiliser que des milieux de culture ayant servi à l'élaboration de la base de données tels que les milieux COS, BCYE, chocolat... Bien que le milieu BCP n'ait pas servi à l'élaboration de la base de données, nous avons tout de même obtenus des résultats comparables à ceux obtenus à l'aide du COS (respectivement 87% et 91% d'identifications correctes) sur la collection de souches de l'OFN de l'année 2014, *i.e.* représentative de l'épidémiologie française (Lebeaux *et al.*, 2018). Nous encourageons donc les biologistes à faire une tentative d'indentification à l'aide du MALDI-ToF MS lorsqu'ils ont réussi à isoler une souche à partir d'un prélèvement même lorsque le milieu de culture utilisé ne fait pas partie de ceux recommandés pour l'identification par spectrométrie de masse.

Enfin, la prévalence des espèces a également son importance dans l'identification des souches de *Nocardia*. En effet, les espèces de plus forte prévalence clinique sont également celles qui sont les mieux représentées dans la base de données (Girard *et al.*, 2016). Nous avons d'ailleurs constaté de très bons taux d'identification pour ces espèces allant jusqu'à 100% d'identification correcte pour les espèces *N. cyriacigeorgica* et *N. farcinica*. A l'inverse, les espèces absentes de la base de données n'ont pas été identifiées dans 100% des cas et celles appartenant à des complexes proches d'espèces présentes dans la base de données ont conduit à de mauvaises identifications. En effet, les espèces formant des complexes phylogénétiques proches telles que *N. nova* qui regroupe *N. cerradoensis*, *N. kruczakiae*, *N. aobensis*, *N. mikamii* et *N. africana* (McTaggart *et al.*, 2010 ; Tamura *et al.*, 2018) ne sont pas encore bien discriminées par MALDI-ToF MS (Girard *et al.*, 2016 ; Body *et al.*, 2018).

Ces travaux de thèse ont donc permis une meilleure compréhension globale de l'écologie de *Nocardia* en identifiant les paramètres environnementaux qui influent sur le développement d'espèces pathogènes et ainsi améliorer nos connaissances sur la physiopathologie de l'espèce *N. cyriacigeorgica*. Ceci a été rendu possible grâce à l'amélioration des outils d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF ainsi que la métataxonomie basée sur le marqueur *hsp65*, mais également l'utilisation d'outils déjà à notre portée comme la MLSA et le modèle murin CLP 30 %.

## Conclusions de ces travaux de thèse

Le premier objectif de ce travail de thèse était d'évaluer l'impact de la pollution anthropique sur l'enrichissement et la diversité en Actinobactéries pathogènes, en particulier celles du genre *Nocardia*. En effet, lors d'une nocardiose, on se pose souvent la question de la source exacte de la contamination par cet agent pathogène connu pour être d'origine environnementale. Cela pourrait donner lieu à des explications plus précises au patient quant à la niche écologique de cet agent étiologique et surtout les risques encourus par l'exposition à ce type d'environnement ainsi qu'à ceux présentant des caractéristiques comparables à celui étudié. Notre projet s'est focalisé sur le suivi de la diversité spatio-temporelle de ces bactéries. Pour cela, nous avons choisi le bassin d'infiltration Django-Reinhardt situé dans l'Est Lyonnais car c'est un environnement anthropisé qui concentre une grande diversité de polluants d'origine urbaine (HAP, ETM, etc.). Pour déterminer la biodiversité des *Nocardia*, directement dans des échantillons d'ADN complexes extraits des sédiments urbains de ce bassin, nous avons développé une base de données utilisant pour la première fois le gène *hsp65* en métabarcoding. En parallèle, une évaluation de plusieurs paramètres physico-chimiques (granulométrie, humidité, HAP, ETM) a également été faite pour chacun de ces échantillons complexes afin de corréliser l'ensemble de ces données et ainsi identifier les conditions environnementales pouvant favoriser le développement de ces bactéries.

Grâce au marqueur développé, nous avons constaté qu'un environnement urbain comme celui étudié ici peut héberger jusqu'à 25 espèces différentes de bactéries appartenant au genre *Nocardia* dont la très pathogène *N. cyriacigeorgica*. Des espèces qui font partie des plus impliquées dans la nocardiose à l'échelle mondiale (*N. cyriacigeorgica*, *N. nova*, *N. abscessus*) font également partie de celles qui sont les plus retrouvées dans les sédiments du bassin d'infiltration Django-Reinhardt. De plus, ces résultats ont également permis pour la première fois d'avoir connaissance de certaines tendances concernant plusieurs facteurs physico-chimiques pouvant expliquer l'installation de communautés de cette bactérie dans ce type d'environnement. En effet, la présence d'espèces pathogènes de *Nocardia* est fortement corrélée à celles d'ETM. Ces ETM pourraient donc être proposés comme indicateurs de la présence d'espèces pathogènes de *Nocardia*. A l'inverse, même si nous avons détecté des *Nocardia* pathogènes dans des échantillons pollués aux HAP, des tendances montrant une corrélation négative entre ces polluants et les *Nocardia* pathogènes ont été observées. Les HAP ne peuvent pas être utilisés comme indicateur de la présence de *Nocardia* pathogènes. De même, une trop forte humidité (au-delà de 50-80 %) aurait tendance à limiter le développement des espèces indigènes de ce genre bactérien, au bénéfice des espèces pathogènes. Ce marqueur ciblant les Actinobactéries a donc permis une résolution au niveau de l'espèce et non plus seulement au niveau de famille ou du genre comme c'est le cas du marqueur *rrs*.

Notre deuxième objectif était de connaître plus en profondeur les caractéristiques génétiques, génomiques, de concentration et de virulence des souches de l'espèce pathogène

*N. cyriacigeorgica* présentes dans le bassin d'infiltration et ainsi avoir une idée plus précise des dangers potentiels que les environnements anthropisés pollués représentent pour les populations avoisinantes et à risque. Notre étude de détection de *Nocardia* par des méthodes culturales nous a permis l'isolement pour la première fois de plusieurs souches urbaines appartenant à cette espèce. A ce sujet, nous avons détecté des concentrations allant jusqu'à  $1.0 \times 10^3$  UFC/g de sédiment sec lors des trois campagnes d'échantillonnage réalisées sur une année, ce qui indique une installation pérenne de la bactérie dans cet environnement.

Pour l'étude phylogénétique, nous avons bénéficié de la mise à disposition d'une collection de souches d'origine clinique ainsi que de leurs données clinico-microbiologiques fournies par l'Observatoire Français des Nocardioses et en provenance de plusieurs villes françaises. Notre étude a été élargie avec des séquences nucléotidiques extraites de Genbank et provenant de patients de plusieurs pays (Canada, Chine, Etats-Unis, Inde). Cette collection de souches et de séquences a été comparée aux souches urbaines ainsi qu'aux séquences obtenues par métabarcoding provenant de sédiments du bassin d'infiltration Django-Reinhardt. Pour cela, nous avons utilisé une analyse de MLSA comportant la concaténation des 4 gènes (*rrs-hsp65-sodA-secA1*). Nous avons observé que les souches de *N. cyriacigeorgica* provenant du bassin se placent dans les phylogroupes historiques I et III que l'on peut retrouver dans la littérature. Ces deux phylogroupes contiennent aussi des souches d'origine clinique dont une provenant d'un patient Lyonnais résidant dans la zone géographique où se trouve le bassin (PI). Cette proximité phylogénétique entre nos souches urbaines et des souches cliniques en provenance d'autres villes françaises laisse penser que d'autres environnements en France, présentant certaines caractéristiques communes à celles du bassin étudié, pourraient être à l'origine de la contamination chez les patients dont ces souches cliniques proviennent. De plus, le phylogroupe III est celui qui regroupe la plupart des souches environnementales isolées dans ce qui semble être un complexe clonal bien installé dans le bassin d'infiltration où un suivi des populations de *Nocardia* a été effectué sur le long terme entre 2013 et 2016. Cependant, aucun de ces deux phylogroupes n'héberge la souche clinique hautement dangereuse GUH-2 qui se trouve dans le phylogroupe II et qui laisse penser que sa niche écologique doit diverger en grande mesure de celle étudiée ici. On peut en déduire que quel que soit le phylogroupe d'appartenance (PI, PII ou PIII) ou l'origine (clinique ou environnementale) de la souche, tout isolat appartenant à l'espèce *N. cyriacigeorgica* est potentiellement pathogène pour l'homme.

Nos travaux ayant déterminé la présence pérenne de *N. cyriacigeorgica* dans le bassin d'infiltration et afin de pouvoir mesurer le risque associé, une souche de *N. cyriacigeorgica* issue de cet environnement (EML446) a été choisie comme représentante pour des expériences complémentaires. Sa virulence a été comparée à celle de la souche clinique de référence GUH-2 appartenant à cette même espèce. L'analyse des génomes a permis de comparer les gènes de virulence de ces deux souches. Ce travail a permis de reconnaître 130 CDS qui pourraient être impliqués dans la virulence de la souche environnementale dont 96 également présents dans la souche GUH-2. Compte tenu de cette étude de génomique



comparative, les résultats laissent présager une virulence semblable entre les souches urbaines de *N. cyriacigeorgica* et la souche hautement pathogène GUH-2.

Afin de tester cette hypothèse, à savoir que deux souches relativement éloignées phylogénétiquement, mais appartenant à la même espèce *N. cyriacigeorgica* avec des origines différentes, peuvent présenter une virulence semblable, des expérimentations sur modèle murin d'immunoparalysie transitoire (CLP 30 %) ont été mises en place. Différentes doses d'inoculum ont été administrées aux souris afin de déterminer les doses infectantes et létales de ces deux souches. La virulence a été évaluée par un suivi de la survie des souris après des injections à différentes doses ( $1,0 \times 10^3$ ;  $1,0 \times 10^5$ ;  $1,0 \times 10^6$  et  $1,0 \times 10^7$  UFC/ souris) des deux souches de *N. cyriacigeorgica* GUH-2 et EML446. La dissémination de ces bactéries après l'injection a également été suivie à différents temps par biologie moléculaire ainsi que par culture. Les lésions histologiques ont aussi été visualisées pour la souche EML446. Notre étude a permis d'établir la dose infectante à  $1,0 \times 10^6$  UFC/ souris et la dose létale à seulement un log de plus, soit  $1,0 \times 10^7$  UFC/ souris. Après une injection de la dose infectante, des survies similaires ont été observées, quelle que soit la souche injectée lors des 25 premiers jours. Cependant, une seconde vague de mortalité due à GUH-2 laisse penser que cette souche est plus virulente que la souche environnementale EML446 qui présente pourtant une dissémination dans la quasi-totalité des organes de souris 41 jours après l'inoculation. De même, cette souche EML446 induit des lésions histopathologiques semblables à celles habituellement rencontrées en clinique dans des cas de nocardiose humaine. La souche environnementale EML446 présente donc une virulence semblable à la souche GUH-2 mais avec un processus infectieux apparaissant plus tardivement.

La nocardiose, de par ses symptômes aspécifiques et les difficultés de mise en culture et d'identification des germes impliqués, est une maladie qui demeure encore largement sous diagnostiquée. La technologie la plus répandue actuellement dans les laboratoires de bactériologie pour l'identification bactérienne, le MALDI-ToF MS, n'est pour l'heure pas suffisamment résolutive pour permettre une identification fiable d'un certain nombre de genres bactériens, notamment les *Nocardia*. Le troisième objectif de cette thèse visait donc à évaluer les performances de la nouvelle base de données Vitek® MS IVD V3.0 pour l'identification en routine des *Nocardia*. En partenariat avec la société bioMérieux et les Hospices Civils de Lyon, nous avons évalué une collection de souches de *Nocardia* provenant de l'OFN et cultivées sur deux milieux de culture différents. Nos travaux ont confirmé la nécessité du recours à une étape intermédiaire d'extraction des protéines puisque le dépôt direct sur cible ne donne pas de résultats d'identification suffisants pour valider la méthode. Cependant, plusieurs dépôts voire extractions peuvent être nécessaires afin d'aboutir à une identification de la souche étudiée. En revanche, contrairement à ce que certains auteurs concluent, il serait possible d'obtenir de bons taux d'identification correcte avec un milieu qui n'a pas été utilisé pour construire la base de données du système comme c'est le cas du milieu BCP (bromocrésol pourpre). La condition pour obtenir de bons taux d'indentification réside en réalité dans le nombre de spectres présents dans la base de données pour l'espèce à



identifier. En effet, plus il y aura de spectres pour une espèce donnée, meilleure sera la probabilité d'avoir une identification correcte, et inversement. En conclusion, la technologie du MALDI-ToF MS est relativement mature pour l'identification des *Nocardia* et nécessite principalement des incréments de la base de données avec un plus large spectre d'espèces mais également plus de représentants des espèces déjà présentes afin d'avoir une identification bactérienne plus exhaustive et fine.

Pour conclure, cette thèse a permis de mettre en évidence pour la première fois une virulence comparable entre des souches urbaines et cliniques de l'espèce *N. cyriacigeorgica*, tout en permettant une meilleure connaissance de l'écologie de la bactérie, notamment au niveau des conditions environnementales telles que la pollution aux ETM ou l'humidité qui favorisent son développement. Enfin, nous avons proposé des outils d'identification qui permettent une analyse plus rapide et fine de ces communautés de *Nocardia*, dans un contexte aussi bien environnemental qu'hospitalier.



## Perspectives de recherche à mener à la suite de ces travaux de thèse

Ces travaux de thèse se sont inscrits dans une étude écologique du suivi des communautés d'Actinobactéries pathogènes et en particulier de l'espèce *N. cyriacigeorgica* dans un milieu urbain tel que les bassins d'infiltration connus pour leur capacité à concentrer des polluants chimiques sous forme particulaire et pouvant être assimilables par ce type de microorganismes grâce à leurs propriétés hydrophobes. Les différents thèmes abordés nous ont permis d'avoir un aperçu de la distribution spatio-temporelle des formes pathogènes des Actinobactéries en fonction des propriétés physico-chimiques des sédiments urbains, permettant ainsi d'approfondir nos connaissances sur leur réservoir environnemental précis et ainsi mieux évaluer le risque microbiologique (compte tenu de sa concentration dans ces sédiments si l'on compare avec la dose infectieuse et leur virulence) associé à leur présence dans ces environnements, ce qui pourrait expliquer leur émergence en milieu hospitalier.

Les perspectives résultant de ces travaux sont nombreuses, notamment :

### 1) Elargissement du marqueur *hsp65* pour la détection d'autres Actinobactéries.

Nos travaux ont démontré le pouvoir discriminant à l'échelle de l'espèce, voire de la sous-espèce, du marqueur *hsp65* utilisé en métabarcoding. En revanche, nos résultats ont démontré 40 % de séquences d'Actinobactéries non identifiées au niveau de ce phyla. Les chiffres peuvent être plus importants comme pour le genre *Streptomyces* où quasiment 60 % des séquences n'ont pu être assignées à une espèce. Il serait donc intéressant d'incrémenter la base de données actuelle avec plus de représentants de chaque genre d'Actinobactéries afin d'augmenter le taux d'indentification à l'espèce et ainsi diminuer les « unclassified ». En effet, la base de données a été construite à partir des séquences de *Nocardia* et *Gordonia* que nous avons fait séquencer (issues de l'OFN ou des isolats environnementaux issus de nos travaux de recherche) ainsi que celles disponibles sur GenBank, mais un certain nombre de genres d'Actinobactéries n'y sont pas présents. Il serait intéressant de trouver des équipes de recherches ayant l'expertise de ces genres afin de récupérer, si possible, ces séquences *hsp65*. L'autre piste d'amélioration se situe au niveau de la qualité des séquences *hsp65* disponibles en ligne qui peut être discutable. Il serait judicieux d'établir un cahier des charges stricts afin de connaître les caractères permettant d'inclure ou d'exclure des séquences de la base de données telles que la longueur des fragments, les amorces utilisées pour l'amplification ou encore le fait qu'elles apparaissent dans des articles publiés. Afin de raisonner en abondance absolue et non plus relative lors du retraitement des données de métabarcoding, il serait intéressant de développer une PCR quantitative sur le marqueur *hsp65* comme c'est actuellement le cas avec le gène *rrs*. Enfin, il ne faut pas oublier que nos travaux n'ont été menés que dans un seul type d'environnement (sédiments urbains pollués) et ne permettent de donner qu'une image partielle des capacités/limites de cette nouvelle approche en métabarcoding. Multiplier les environnements (prairies, forêts, mers...) et types de matrices

(sol, eau, air, biofilms...) permettrait d'avoir une approche écologique plus globale quant à ce nouvel outil pour le suivi des communautés d'Actinobactéries.

### 2) Capacité de survie de *Nocardia* dans des environnements pauvres en oxygène

Des travaux antérieurs ont déjà démontré la présence d'ADN de *Nocardia* dans la nappe phréatique située sous le bassin d'infiltration Django-Reinhardt (Stage M2 Eva Gutbraut, 2015). Ces environnements souterrains sont connus pour avoir des taux d'oxygène relativement faibles (Thèse J. Voisin, 2017). Tenant compte de ces informations, si l'on s'intéresse aux propriétés physiologiques de *Nocardia*, ceci nous laisse penser que cette bactérie aurait la capacité de se développer dans des conditions de microaérobie, questionnant donc son caractère aérobie stricte. A ce jour, il n'existe aucune étude sur *Nocardia* quant à la compréhension de cette propriété de colonisation des environnements proches de l'anoxie. D'autre part l'utilisation des génomes de *N. cyriacigeorgica* séquencés lors de ces travaux pourrait également permettre d'aller au-delà de l'identification de *Nocardia* dans ces environnements. En analysant la présence de gènes de dénitrification pouvant exprimer les fonctions de réduction de l'oxygène lors du cycle de l'azote. Il pourrait être envisagé de suivre l'étape de dénitrification par mesure du dégagement de protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O) en conditions anaérobie. Compte tenu nos travaux qui ont mis en évidence la présence de *Nocardia* dans les sédiments du bassin d'infiltration Django-Reinhardt, la possibilité d'une percolation de ces bactéries vers la nappe phréatique se pose. Afin de compléter son cycle de survie dans l'environnement, il serait intéressant d'initier des études sur le suivi du passage de cette bactérie vers la nappe phréatique et pouvoir ainsi évaluer les risques de contamination des aquifères. Pour cela, des études en laboratoire sur colonnes artificielles reconstituant le lithofaciès sous le bassin d'infiltration Django-Reinhardt pourraient être envisagées afin de mettre en évidence les conditions qui favorisent le passage de la bactérie de la surface du bassin jusqu'à l'aquifère. Afin de faciliter le suivi des bactéries dans les colonnes, ou en cas de co-inoculation avec un autre germe, il serait utile de posséder des souches de *N. cyriacigeorgica* marquées par fluorescence. Les difficultés actuellement rencontrées pour insérer des gènes dans ce genre bactérien nous poussent à nous tourner vers la nouvelle technique très prometteuse du CRISPR/Cas 9 dont les résultats sur *Streptomyces* (Tao et al., 2018) et *Mycobacterium* (Sun et al., 2018) sont très encourageants.

### 3) Description de nouvelles espèces de *Nocardia*

Des travaux antérieurs ainsi que nos travaux présentés ici ont montré que l'espèce *N. cyriacigeorgica* présente une forte variabilité infraspécifique, résultant en une division en trois phylogroupes distincts. En effet, l'ensemble de nos souches environnementales isolées du bassin d'infiltration Django-Reinhardt lors de ces travaux de thèse ont montré un regroupement au sein du phylogroupe III qui comportait également des souches provenant de patients français. Cette diversité génétique constatée au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* mériterait d'être étudiée de façon plus approfondie, notamment en vue d'un classement

taxonomique plus précis. Lors de nos travaux, les génomes d'un représentant de chacun des trois phylogroupes ont été séquencés. Nous proposons qu'une étude polyphasique (analyse génomique, caractères biochimiques, microscopiques, d'antibiorésistance) soit initiée afin de caractériser ces phylogroupes au sein de *N. cyriacigeorgica* et ainsi confirmer la présence de sous-espèces ou, au contraire, de nouvelles espèces appartenant au genre *Nocardia*. Le séquençage des génomes a permis de calculer les valeurs d'ANI pour les représentants des trois phylogroupes avec des valeurs confirmant l'hypothèse de deux nouvelles espèces (0,75 – 0,78 GUH-2/EML446 et GUH-2/DSM44484<sup>T</sup> respectivement). Il en est de même pour la dDDH avec des valeurs de 41,1% pour GUH-2/EML446 et 47,1% pour GUH-2/DSM44484<sup>T</sup>. Il serait également nécessaire d'élargir ces résultats par une approche polyphasique prenant en compte les caractères phénotypiques et d'antibiorésistance de ces trois phylogroupes afin de mieux caractériser chacune des nouvelles espèces décrites au sein des phylogroupes I (EML446) et II (GUH-2)

#### 4) Amélioration du MALDI-ToF MS pour l'identification de *Nocardia*

Nos travaux ont démontré l'intérêt de l'utilisation du MALDI-ToF MS pour l'identification en routine des germes de *Nocardia* impliqués en pathologie humaine. En revanche, les espèces de faible prévalence n'étant pas ou peu présentes dans la base de données, leur identification par cette technologie est quasiment impossible. Lors de ces travaux de thèse, de très nombreuses souches de *Nocardia* ont été isolées et identifiées par séquençage du gène *hsp65*. Celles appartenant à des espèces pathogènes ont par la suite été identifiées avec succès par MALDI-ToF MS. Il serait intéressant d'élargir la base de données notamment avec des spectres d'espèces non pathogènes mais fréquemment isolées dans l'environnement, comme c'est le cas pour le genre *Streptomyces* qui n'est que rarement impliqué en pathologie humaine, mais dont les intérêts industriels sont très importants. Il serait également utile d'évaluer les performances de la technique d'extraction des protéines ribosomales directement sur la plaque de dépôt et non plus *via* une étape intermédiaire d'extraction en tube afin de gagner en temps et en simplicité d'utilisation. Ces deux améliorations permettraient l'identification fiable, rapide et peu onéreuse de *Nocardia*.



## **PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES**





# Littérature :

## Articles à comité de lecture

### Articles en préparation

Durand T., **Vautrin F.**, Chanard E., Mallet B., Bergeron E., Dumitrescu O., Dauwalder O., Laurent F., Rodriguez-Nava V., *en cours*. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for the identification of *Nocardia*.

**Vautrin F.**, Dubost A., Bergeron E., Bourgeois E., Cournoyer B., Mourier B., Winiarski T., Rodriguez-Nava V., *en cours*. Diversity of Actinobacteria in an Anthropized Environment; *hsp65* a New Metabarcoding Tool. *In* Frontiers in Microbiology.

### Article soumis

**Vautrin F.**, Pujic P., Paquet C., Bergeron E., Mouniée D., Marchal T., Salord H., Bonnet-Garin J-M., Cournoyer B., Winiarski T., Louzier V., Rodriguez-Nava V., *soumis*. Health hazards associated with *Nocardia* cells colonizing urban infiltration systems. *In* Environment International.

## Article publié en 2020

Colin Y., Marjolet L., Bouchali R., Marti R., **Vautrin F.**, Rodriguez-Nava V., Blaha D., Winiarski T., Mermillod-Blondin F., Cournoyer B., soumis. Incidence of bacterial groups originating from urban runoffs and artificial infiltration systems on aquifer microbiome community structures. *In Hydrology and Earth System Sciences*; <https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>.

## Articles publiés en 2019

Durand T., **Vautrin F.**, Chanard E., Mallet B., Bergeron E., Dumitrescu O., Dauwalder O., Laurent F., Rodriguez-Nava V., *in press*. Assessment of Vitek® MS IVD database V3.0 for identification of French isolates of *Nocardia* spp. Using two different culture media and comparing direct smear and protein procedures. *In European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*; <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03758-x>.

**Vautrin F.**, Dubost A., Abrouk D., Bergeron E., Cournoyer B., Louzier V., Winiarski T., Rodriguez-Nava V., Pujic P., 2019. Draft Genomes of *Nocardia cyriacigeorgica* and *N. asteroides*. *In Microbial Resource Announcement*; 8:e00600-19, /mra/8/33/MRA.00600-19.atom; <https://doi.org/10.1128/MRA.00600-19>.

Bethencourt L., **Vautrin F.**, Taib N., Dubost A., Castro-Garcia L., Imbaud O., Abrouk D., Fournier P., Briolay J., Nguyen A., Normand P., Fernandez M.P., Brochier-Armanet C., Herrera-Belaroussi A., 2019. Draft genome sequences for three unisolated *Alnus*-infective *Frankia* Sp+ strains, AgTrS, AiOr and AvVan, the first sequenced *Frankia* strains able to sporulate *in-planta*. *In Journal of Genomics*; 7:50–55; <https://doi.org/10.7150/jgen.35875>

## Article publié en 2017

Guyonnet J.\*, **Vautrin F.\***, Meiffren G., Labois C., Cantarel A., Michalet S., Comte G., Haichar Z., 2017. The effects of plant nutritional strategy on soil microbial denitrification activity through rhizosphere primary metabolites. *In FEMS Microbiology Ecology*; 93; <https://doi.org/10.1093/femsec/fix022>.

\* les deux auteurs ont contribué à parts égales à ce travail

## Rapports d'activité

Bacot L., *et al.*, 2016. Rapport d'activité scientifique OTHU 2013-2016. *Décembre 2016*, 206 p.

Youenou B., Marjolet L., Bourgeois E., Voisin J., Marti R., Ribun S., Gleizal A., Tilly B., Bouchali R., Colin Y., Bernardin-Souibgui C., **Vautrin F.**, Rodriguez-Nava V., Blaha D., Cournoyer B., 2019. Quels sont les contaminants microbiologiques transportés par les RUTP et leur niveau de dangerosité pour l'Homme ?

## Présentations orales :

### Conférence internationale

Colin Y., Marjolet L., Marti R., Bouchali R., **Vautrin F.**, Rodriguez-Nava V., Blaha D., Winiarski T., Voisin J., Mermillod-Blondin F., Cournoyer B., 2019. Transfert significatif de bactéries des eaux de ruissellement vers les nappes impactées par les techniques alternatives de gestion des eaux pluviales. Congrès Novatech, Lyon.

**Vautrin F.**, Meiffren G., Labois C., Guyonet J., Rozier C., Michalet S., Comte G., Haichar Z., 2015. Profiling of primary metabolites of *Poaceae* root exudates in soil. 2<sup>ème</sup> symposium international AFERP/STOLON, Lyon.

### Conférence nationale

**Vautrin F.**, Winiarski T., Dubost A., Bardel C., Gutbraut E., Le Floch A., Pujic P., Bergeron E., Mouniée D., Durand T., Gervais J., Marjolet L., Gleizal A., Cournoyer B., Rodriguez-Nava V., 2017. Quand l'environnement s'invite à l'hôpital, cas particulier de *Nocardia*. Congrès ACTINO, Lyon

### Autres

**Vautrin F.**, Restagno D., Pujic P., Paquet C., Bergeron E., Mouniée D., Martin C., Durand T., Cournoyer B., Bonnet-Garin J-M., Winiarski T., Louzier V., Rodriguez-Nava V., 2017. *Nocardia cyriacigeorgica*, de l'environnement au patient. Décrypt'thèse, journée scientifique de l'école doctorale E<sub>2</sub>M<sub>2</sub> (Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie et Modélisation).

**Vautrin F.**, Bergeron E., Winiarski T., Rodriguez-Nava V., 2017. Milieu urbain et exposition aux Actinomycètes pathogènes. Rencontre annuelle du laboratoire d'Ecologie Microbienne, Lyon.

**Vautrin F.**, Bergeron E., Winiarski T., Rodriguez-Nava V., 2017. *Nocardia cyriacigeorgica*, de l'environnement au patient. Animation scientifique du laboratoire d'Ecologie Microbienne, Lyon.

## Présentations posters :

### Conférences internationales

Buresova A., Kopechy J., Rodriguez-Nava V., Sagova-Mareckova M., **Vautrin F.**, Alonso L., Moenne-Loccoz Y., Omelka M., 2019. Comparison of cave Actinobacteria communities according to *hsp65* and *16S rRNA* genes. 8<sup>ème</sup> congrès des microbiologistes européens (FEMS 2019), Vienne.

**Vautrin F.**, Pujic P., Paquet C., Bergeron E., Marjolet L., Gleizal A., Gervais J., Cournoyer B., Winiarski T., Louzier V., Rodriguez-Nava V., 2018. *Nocardia*, a human pathogen from the environment. 28<sup>ème</sup> congrès européen en microbiologie clinique et maladies infectieuses (ECCMID), Madrid.

Durand T., Bergeron E., **Vautrin F.**, Polsinelli S., Girard V., Durand G., Dumitrescu O., Dauwalder O., Laurent F., Rodriguez-Nava V., 2018. Evaluation of VITEK MS V3.0 for *Nocardia* pathogenic species. Comparison of two different growth media. 28<sup>ème</sup> congrès européen en microbiologie clinique et maladies infectieuses (ECCMID), Madrid.

Bergeron E., **Vautrin F.**, Durand T., Laurent F., Rodriguez-Nava V., 2018. *In vitro* susceptibility testing of cefuroxime, cefexime, cefpodoxime, cefotaxime, ceftaroline, ceftobiprole, linezolid and tedizolid against isolates of *Nocardia* by using the E-test method. 28<sup>ème</sup> congrès européen en microbiologie clinique et maladies infectieuses (ECCMID), Madrid.

**Vautrin F.**, Le Floch A., Bergeron E., Marjolet L., Gervais J., Winiarski T., Rodriguez-Nava V., 2017. *Nocardia*, un pathogène au fil de l'eau. 1<sup>er</sup> congrès international en écotoxicologie microbienne (prix poster), Lyon.

### Conférences nationales

Durand T., Bergeron E., **Vautrin F.**, Polsinelli S., Girard V., Durand G., Dumitrescu O., Dauwalder O., Laurent F., Rodriguez-Nava V., 2018. Evaluation of VITEK MS V3.0 for *Nocardia* pathogenic species. Comparison of two different growth media. 38<sup>ème</sup> Réunion interdisciplinaire en chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), Paris.

**Vautrin F.**, Restagno D., Pujic P., Paquet C., Bergeron E., Mounié D., Martin C., Durand T., Cournoyer B., Bonnet-Garin J-M., Winiarski T., Louzier V., Rodriguez-Nava V., 2016. *Nocardia cyriacigeorgica*, de l'environnement au patient. 36<sup>ème</sup> Réunion interdisciplinaire en chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), Paris.

Durand T., **Vautrin F.**, Chanard E., Mallet B., Bergeron E., Laurent F., Dauwalder O., Rodriguez-Nava V., 2016. Identification des *Nocardia* par spectrométrie de masse Bruker Biotyper. 36<sup>ème</sup> Réunion interdisciplinaire en chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), Paris.

**Vautrin F.**, Bergeron E., Winiarski T., Rodriguez-Nava V., 2016. *Nocardia*, un nouvel indicateur de pollution anthropique. 7<sup>ème</sup> Journées doctorales en hydrologie urbaine (JDHU), Nantes.

**Autres**

**Vautrin F.**, Le Floch A., Gutbraut E., Bergeron E., Mouniée D., Marjolet L., Gleizal A., Gervais J., Cournoyer B., Winiarski T., Rodriguez-Nava V., 2017. *Nocardia*, un nouvel indicateur de pollution anthropique. 5<sup>ème</sup> séminaire scientifique de l'OTHU, Villeurbanne.

**Vautrin F.**, Le Floch A., Bergeron E., Marjolet L., Gervais J., Winiarski T., Rodriguez-Nava V., 2016. *Nocardia*, un pathogène au fil de l'eau. Journées scientifiques de la FST (Faculté des Sciences et Technologies), L'eau dans tous ses états, Villeurbanne.







## Short Research Paper

# Draft genome sequences for three unisolated *Alnus*-infective *Frankia* Sp<sup>+</sup> strains, AgTrS, AiOr and AvVan, the first sequenced *Frankia* strains able to sporulate *in-planta*

Lorine Bethencourt<sup>1</sup>, Florian Vautrin<sup>1</sup>, Najwa Taib<sup>2</sup>, Audrey Dubost<sup>1</sup>, Lucia Castro-Garcia<sup>2</sup>, Olivier Imbaud<sup>2</sup>, Danis Abrouk<sup>1</sup>, Pascale Fournier<sup>1</sup>, Jérôme Briolay<sup>3</sup>, Agnès Nguyen<sup>4</sup>, Philippe Normand<sup>1</sup>, Maria P. Fernandez<sup>1</sup>, Céline Brochier-Armanet<sup>2</sup>, Aude Herrera-Belaroussi<sup>1</sup>✉

1. Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, INRA, UMR 1418, 43 bd du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne, France
2. Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, 43 bd du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne, France
3. Univ Lyon, Université Lyon 1, DTAMB, FR 3728 BioEnviS, 43 bd du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne, France
4. Biofidal, 170 av Gabriel Péri, F-69518 Vaulx-en-Velin, France

✉ Corresponding author: Herrera-Belaroussi Aude, UMR 5557 Ecologie Microbienne 43, Boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel: (33) 472 448 200 E-mail: aude.herrera-belaroussi@univ-lyon1.fr

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2019.04.19; Accepted: 2019.07.22; Published: 2019.09.17

## Abstract

Actinobacteria from genus *Frankia* are able to form symbiotic associations with actinorhizal plants including alders. Among them, Sp<sup>+</sup> strains are characterized by their ability to differentiate numerous sporangia inside host plant cells (unlike “Sp-” strains unable of *in-planta* sporulation). Here, we report the first genome sequences of three unisolated Sp<sup>+</sup> strains: AgTrS, AiOr and AvVan obtained from *Alnus glutinosa*, *A. incana* and *A. alnobetula* (previously known as *viridis*), respectively (with genome completeness estimated at more than 98%). They represent new *Frankia* species based on Average Nucleotide Identity (ANI) calculations, and the smallest *Alnus*-infective *Frankia* genomes so far sequenced (~5 Mbp), with 5,178, 6,192 and 5,751 candidate protein-encoding genes for AgTrS, AiOr and AvVan, respectively.

Key words: *Frankia*, AgTrS, AiOr, AvVan

## Genome Announcement

*Frankia* strains are filamentous actinobacteria able to fix nitrogen and to form symbiotic associations with actinorhizal plants, leading to the formation of root nodules where trophic exchanges between plant and bacteria take place. Phylogenetic studies showed that clades within *Frankia* genus are strongly linked to infection groups, with Cluster 1 containing strains infective on *Alnus* and *Myrica* [1] [2]. *Frankia* is also characterized by its ability to differentiate sporangia. Most isolated *Frankia* strains have been described as sporulating *in-vitro* [1] [3]. However, certain strains, called “Sp<sup>+</sup>”, have the ability to sporulate inside host

cells (unlike “Sp-” strains unable of *in-planta* sporulation) [4]. Sp<sup>+</sup> strains have been commonly reported in association with alders, especially *A. glutinosa*, *A. incana* and *A. alnobetula* (formerly *A. viridis*) species. In contrast to Sp- strains, up to date, Sp<sup>+</sup> strains are still totally culture recalcitrant (none are available in pure culture despite many isolation attempts) [5]. Furthermore, we recently described their narrower host specificity [6], suggesting a strong host dependence. It was hypothesized that Sp<sup>+</sup> strains could have evolved towards an obligatory symbiont status with spores representing their only form of

survival outside the host. Indeed, produced early and abundantly in host cells, spores would be released during nodule senescence, thus enabling Sp+ strains to survive and disseminate in the soil in a free state [7]. Recently, MLSA-based studies directly conducted on Sp+ nodules collected from various geographical sites confirmed that *Alnus*-infective Sp+ strains belonged to Cluster 1 as expected. These studies also showed that the Sp+ trait was associated with distinct phylogenetic lineages, strongly correlated to the host species [7] [2], suggesting that Sp+ strains had emerged several times independently over the course of *Frankia* diversification. To date, more than thirty *Frankia* strains covering the diversity of the *Frankia* genus have been sequenced [8], helping to predict and identify pathways involved in the biosynthesis of natural products by *Frankia* [9] [10]. However, no *Frankia* Sp+ genomes have been reported so far. Here, we reported the sequencing of three Sp+ *Frankia* genomes. The main challenge was to get DNA of these unisolated strains directly from nodules, limiting plant DNA contaminations. For this, we optimized a protocol of DNA extraction from *Frankia* spores directly isolated from nodules.

Three *Alnus*-infective Sp+ *Frankia* uncultured strains from Cluster 1, AgTrS, AiOr and AvVan, were selected from nodules collected in 3 distinct alder stands, colonized by *A. glutinosa* (Le Tremblay, Savoie, France), *A. incana* (Ornon, Isère, France) and *A. alnobetula* (Vanoise, Savoie, France), respectively [6]. AgTrS, AiOr and AvVan genomes were sequenced using DNA extracted from spores directly isolated from nodules. For each strain, at least 1 g of surface-sterilized (with calcium hypochlorite 1 % w/v, 15 minutes) and peeled nodules was crushed in liquid nitrogen, with 10 mL of buffer containing 0.5 M Tris-HCl pH 7, 4 % PVP (w/v), 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 0.6 M sucrose, 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Crushed nodule suspensions were successively filtered through 100 µm and 20 µm sterile-filters (Steriflip® Filter Millipore, Life Science-Merck, Paris, France) to separate *Frankia* spores from plant residues and *Frankia* hyphae and vesicles. *Frankia* spore suspensions were homogenized using TissueLyser II, (Qiagen, Courtaboeuf, France) for 40 sec. at 20 Hz before total DNA extraction. DNA was extracted with FastDNA® SPIN for Soil kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) following the supplied procedure. DNA samples were shotgun sequenced after a Nextera XT library construction step (Illumina, USA), using Illumina MiSeq technology with a paired-end 2 × 300-bp run (MiSeq 600 cycles V3 kit, Biofidal, Lyon, France). It is worth noting that an additional sequencing was conducted on AgTrS strain using 454-pyrosequencing technology (Life Sciences-

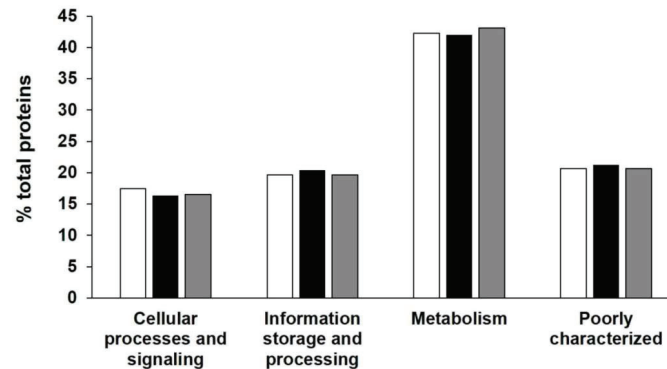
Merck), however this did not allow to improve genome assembly and was thus not performed for the two other strains AiOr and AvVan. Genome assemblies were realised using Unicycler v0.4.3 [11] and their annotation was done with the MicroScope platform version 3.10.0 [12].

A total of 3,480,805 reads were generated for AgTrS, 4,413,305 reads for AiOr and 1,805,928 reads for AvVan. Reads were sorted by nucleotide frequencies using Perl scripts to remove the reads with G+C content ≤ 54 %, since they are likely due to host plant DNA contaminations. More precisely, this threshold was based on the high G+C content reported in *Frankia* genomes [13], with a 72% overall G+C content (only 26 short genes below 54% GC and a single group of 5 very short genes below 54% G+C), against a mean G+C content of alder genomes of ~40% [14]. Based on G+C content read sorting, a final set of 2,401,363 reads was retained for AgTrS, 3,977,168 reads for AiOr and 549,771 reads for AvVan. Seventy-six to 96% of eliminated reads from AgTrS, AiOr and AvVan sequencing data showed percent sequence identity ID > 85 % against *A. glutinosa* genome (accession no. ASM325496v1) and less than 1% against *Frankia* genomes on MicroScope platform (only 0.1 and 0.2% for AgTrS and AvVan, respectively). Genome assemblies based on sorted reads showed a reduced number of contigs as well as an increased mean contig size compared to assemblies based on unsorted reads, suggesting a significant improvement of genome assemblies (Table 1).

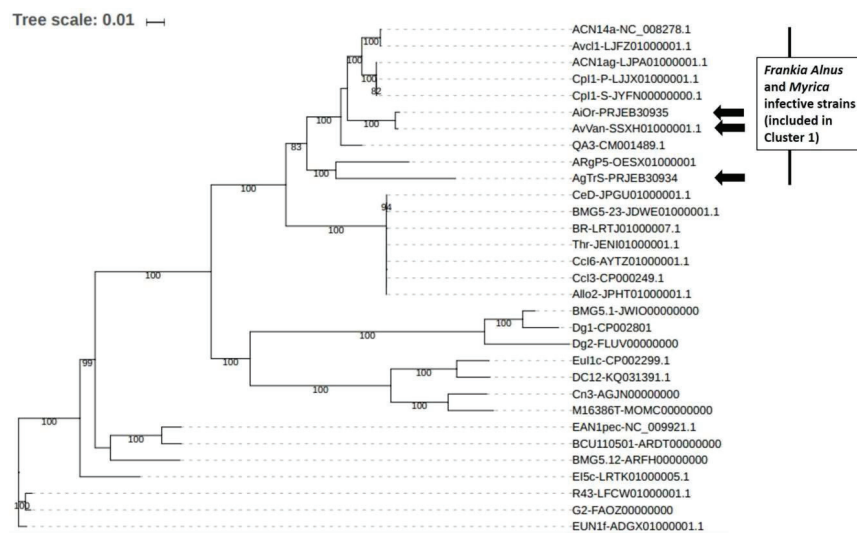
Assembly data are summarized in Table 2 together with genomes associated with *Frankia* species, already described or soon to be. The final draft assembly for AgTrS consisted of 281 contigs (≥ 5 kb). The maximum length and N50 values of the contigs were 96.9 kb and 15.3 kb, respectively, giving a total genome size of 4,882,652 bp. For AiOr, the final draft assembly consisted of 302 contigs (≥ 5 kb) containing 5,504,816 bp, with a maximum contig length of 105.2 kb and a N50 value of 17.4 kb. Both AgTrS and AiOr draft genomes had an overall G+C content of 71.6%. For AvVan, the final draft assembly consisted of 322 contigs (≥ 5 kb), with the contig maximum length and N50 values of 30.1 kb and 6.6 kb, respectively. It contained a total sequence of 4,877,887 bp, with an overall G+C content of 71.4%. Genome completeness was estimated at 98.1% for AgTrS and AvVan strains and 99.4% for AiOr, using CheckM software that assesses the presence of a specific number of markers depending on the studied organism (307 markers for *Frankia* genomes) [15]. The assembled genomes of AgTrS, AiOr and AvVan strains resulted in 5,178, 6,192 and 5,751 candidate protein-encoding genes, respectively (Table 2).

Classification of proteins into their COG functional categories (using MicroScope Platform from Genoscope, <http://www.genoscope.cns.fr/agc/>

microscope/home/index.php) showed similar proportions of proteins in the different functional groups among the three strains (Figure 1).



**Figure 1.** COG functional classification of proteins encoded on the three sequenced Sp+ *Frankia* genomes AgTrS, AiOr and AvVan. Proportions (%) of proteins in each of the COG super-functional categories "Cellular processes and signalling", "Information processing and storage", "Metabolism" and "Poorly characterized", predicted for AgTrS (white bars), AiOr (black bars) and AvVan (grey bars) genomes.



**Figure 2.** Position of the three Sp+ sequenced *Frankia* strains AgTrS, AiOr and AvVan in *Frankia* genus phylogeny based on ribosomal proteins. In addition to Sp+ genomes, a total of 28 sequenced *Frankia* strains were used. For all the 31 genomes, 51 ribosomal protein sequences (total size = 18,582 nt) were included in a supermatrix and the phylogenetic tree was constructed based on the model GTR+I+R4.

**Table 1.** Assembly data of the three Sp+ *Frankia* genomes sequenced, before and after read sorting based on their G+C content (to remove the reads with G+C content  $\leq 54$  %).

Sp+ strain	Data before read sorting			Data after read sorting		
	Read number	Total contig number (with $\geq 5$ kb)	Mean contig size (pb)	Read number	Total contig number (with $\geq 5$ kb)	Mean contig size (pb)
AgTrS	3,480,805	3,559 (366)	2,120	2,401,363 (69%)	612 (281)	7,978
AiOr	4,413,305	1,860 (376)	4,542	3,977,168 (90%)	669 (302)	8,228
AvVan	1,805,928	7,798 (457)	2,876	549,771 (30%)	1,228 (322)	3,962

<http://www.jgenomics.com>

**Table 2.** Genome features of the three Sp+ *Frankia* genomes sequenced (in grey), compared to available *Frankia* genomes (only genomes associated with described or being described *Frankia* species were included in this table and they are all Sp- strains).

Species	Cluster	Strain	Genome accession #	No. of contigs	Genome length (nt)	Genomic G+C content (mol%)	N50 genomic values	Genome coverage	Genome completeness (%) (CheckM)	Original host genus	Associated hosts	Reference
-	1	AgTrS	PRJEB30934	281 (≥ 5 kb)	4,882,652	71.6	15.3	295.1	98.1	<i>Alnus</i>	<i>A. glutinosa</i> , <i>A. incana</i>	This study, [6]
-	1	AiOr	PRJEB30935	302 (≥ 5 kb)	5,504,816	71.6	17.4	433.5	99.4	<i>Alnus</i>	<i>A. incana</i>	This study, [6]
-	1	AvVan	SSXH00000000	322 (≥ 5 kb)	4,877,887	71.4	6.6	67.6	98.1	<i>Alnus</i>	<i>A. viridis</i>	This study, [6]
<i>F. alni</i>	1	DSM 45986 <sup>T</sup> (ACN14a <sup>T</sup> )	NC_008278.1	1	7,497,934	72.8	-	-	-	<i>Alnus</i>	<i>Alnus</i> , Myricaceae	[13]
<i>F. torreyi</i>	1	DSM 44263 <sup>T</sup> (Cp11-S <sup>T</sup> )	JYFN00000000	153	7,624,758	72.4	-	-	-	<i>Comptonia</i>	<i>Alnus</i> , Myricaceae	[19]
<i>F. canadensis</i>	1	DSM 45898 <sup>T</sup> (ARgP5 <sup>T</sup> )	OESX01000001	568	7,730,285	72.4	-	-	-	<i>Alnus</i>	<i>Alnus</i> , Myricaceae	[20]
<i>F. casuarinae</i>	1	DSM 45818 <sup>T</sup> (Ccl3 <sup>T</sup> )	CP000249.1	1	5,433,628	70.1	-	-	-	<i>Casuarina</i>	<i>Casuarina</i> (except <i>Gymnostoma</i> )	[13]
<i>F. coriariae</i>	2	DSM 100624 <sup>T</sup> (BMG5.1 <sup>T</sup> )	JWIO00000000	116	5,795,263	71.0	-	-	-	<i>Coriaria</i>	<i>Datisca</i> , <i>Coriaria</i>	[21]
<i>Candidatus F. californiensis</i>	2	Dg2	FLUV00000000	1066	5,929,312	67.9	-	-	-	<i>Datisca</i>	<i>Rosaceae</i> , <i>Datisca</i>	[22]
<i>Candidatus F. datisciae</i>	2	Dg1	CP002801	1	5,323,186	70.0	-	-	-	<i>Datisca</i>	<i>Datisca</i> , <i>Coriaria</i>	[23]
<i>F. discariae</i>	3	DSM 46785 <sup>T</sup> (BCU110501 <sup>T</sup> )	ARDT00000000	207	7,891,711	72.3	-	-	-	<i>Discaria</i>	<i>Rhamnaceae</i> , <i>Elaeagnaceae</i> , <i>Gymnostoma</i>	[24]
<i>F. elaeagni</i>	3	DSM 46783 <sup>T</sup> (BMG5.12 <sup>T</sup> )	ARFH00000000	139	7,589,313	71.7	-	-	-	<i>Elaeagnus</i>	<i>Rhamnaceae</i> , <i>Elaeagnaceae</i> , <i>Gymnostoma</i>	[25]
<i>F. irregularis</i>	3	DSM 45899 <sup>T</sup> (G2 <sup>T</sup> )	FAOZ00000000	83	9,537,992	70.9	-	-	-	<i>Casuarina</i>	<i>Rhamnaceae</i> , <i>Elaeagnaceae</i> , <i>Gymnostoma</i>	[26]
<i>F. inefficax</i>	4	DSM 45817 <sup>T</sup> (Eu11c <sup>T</sup> )	CP002299.1	1	8,815,781	72.3	-	-	-	<i>Elaeagnus</i>	<i>Elaeagnaceae</i> , <i>Morella</i>	[8]
<i>F. saprophytica</i>	4	DSM 105290 <sup>T</sup> (Cn3 <sup>T</sup> )	AGJN00000000	2	9,978,592	71.8	-	-	-	<i>Coriaria</i>	-	[27]
<i>F. symbiotica</i>	4	DSM 100626 <sup>T</sup> (M16386 <sup>T</sup> )	MOMC00000000.1	174	9,435,764	72.0	-	-	-	<i>Morella</i>	-	[28]

*Frankia* sp. AgTrS, AiOr and AvVan Sp+ strains represent the smallest *Alnus*-infective *Frankia* genomes so far sequenced (~5 Mbp), close to the genome size of *Casuarina*-infective strains previously described as subservient to their host [16]. In order to place the three Sp+ strains in *Frankia* reference phylogeny and to assess the relationships between them, a maximum likelihood phylogeny was inferred (Figure 2). More precisely, the 28 *Frankia* genomes available from NCBI were retrieved (for all these strains, origins and genome features have been summarized by Tisa et al. [8]) and gathered in a local database together with the 3 Sp+ assemblies. This dataset included seven strains from Cluster 1 unable to sporulate *in-planta*, thus Sp- strains: ACN14a as *F. alni* species representative, Avcl1, ACN1ag, Cpl1P, Cpl1S, QA3 and ARgP5. Fifty-one ribosomal proteins were retrieved from the 31 genomes and combined to build a large supermatrix of (18,582 nucleotide

positions) that was used for phylogenetic inferences. The ML tree was built with IQ TREE [17] with the GTR+I+R4 evolutionary model as suggested by the model selection tool implemented in IQ TREE. The branch robustness of the ML tree was estimated with the non-parametric bootstrap procedure Implemented in IQ TREE (100 replicates of the original alignment). The resulting tree confirmed the position of the 3 Sp+ *Frankia* strains AgTrS, AiOr and AvVan into Cluster 1 (Figure 2). In this cluster, AvVan and AiOr appeared closely related to ACN14a, Avcl1, ACN1ag, Cpl1P, Cpl1S, and QA3 strains (bootstrap value = 100%), while AgTrS formed a distinct lineage (Figure 2), suggesting that the three Sp+ strains belonged to two different clades as previously discussed [2] [7].

Average Nucleotide Identity (ANI) calculations were performed in order to accurately distinguish between strains at the species level into the Cluster 1, using the recommended cut-off point of 95 % ANI for

species delineation [18]. All 3 Sp+ *Frankia* genomes AgTrS, AiOr, and AvVan showed less than 90.1% similarity with the genomes of ACN14a and QA3 *Alnus*-infective *Frankia* strains from Cluster 1 (both ACN14a and QA3 have also been included in the phylogenetic tree in Figure 2). Only two genomes, AvVan and AiOr shared 98.5% ANI, which is above the threshold value for species circumscription. These phylogenomic analyses confirm the results obtained by a large survey on Sp+ strains that showed the genetic divergence between *A. glutinosa*-infective strains and *A. alnobetula*- and *A. incana*-infective strains [2] [7]. These results lead to conclude that AgTrS, AiOr and AvVan most likely represent two new distinct species into Cluster 1 of *Frankia* genus, with AiOr and AvVan belonging to the same species.

In conclusion, the genome sequencing of the three *Frankia* Sp+ strains AgTrS, AiOr and AvVan offer a unique opportunity to explore the evolution of their life history traits. Thorough analyses based on comparative genomic approaches with *Frankia* Sp-genomes already available will be performed, for instance to look for clues to Sp+ strain ability to sporulate *in-planta*, to their non-cultivability/host dependence, to their higher narrower host specificity, and eventually clarify their hypothetical status of obligatory symbiont.

### Nucleotide sequence accession numbers

This whole-genome shotgun project has been deposited in DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. PRJEB30934, PRJEB30935 and SSXH00000000 (for *Frankia* sp. AgTrS, AiOr and AvVan). The version described in this paper is the first version. No pure culture of AgTrS, AiOr and AvVan strains are available, these strains are maintained in the UMR5557 Microbial Ecology of Lyon (France) on *Alnus* seedlings (under controlled hydroponic conditions) and they are available as nodules to the research community upon request.

### Acknowledgements

Partial funding was provided by the National Center for Scientific Research (CNRS, grant EC2CO) and the research cluster FR41 BioEnviS. Thanks are expressed to Roxane Bai and Cornelia Alvarez (University Claude Bernard, Lyon1) for technical assistance, as well as Laetitia Cotin-Galvan, Adrien Pozzi and Guillaume Schwob (University Claude Bernard, Lyon1) for help with nodule samplings. We also thank the Genoscope (the French National Sequencing Center, Evry) for help with genome annotations.

### Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

### References

1. Normand P, Orso S, Cournoyer B, Jeannin P, Chapelon C *et al.* Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family *Frankiaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 1-9.
2. Pozzi AC, Bautista-Guerrero HH, Abby SS, Herrera-Belaroussi A, Abrouk D *et al.* Multi-Locus Sequence Analysis and extensive sampling bring new insights on *Frankia* phylogeny and phylogeography. *Syst. Appl. Microbiol.* 2018; S0723-2020(18)30113-9.
3. Callaham D, Del Tredici P, Torrey JG. Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* 1978; 199: 899-902.
4. van Dijk C. Spore formation and endophyte diversity in root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. *New Phytol* 1978; 81: 601-615.
5. Torrey J. Endophyte sporulation in root nodules of actinorhizal plants. *Physiol Plant* 1987; 70: 279-288.
6. Schwob G, Roy M, Pozzi AC, Herrera-Belaroussi A, Fernandez MP. In planta sporulation of *Frankia* spp. as a determinant of alder-symbiont interactions. *Appl Environ Microbiol* 2018; 84: e01737-01718.
7. Pozzi AC, Bautista-Guerrero HH, Nouioui I, Cotin-Galvan L, Pepin R *et al.* In-planta sporulation phenotype: a major life history trait to understand the evolution of *Alnus*-infective *Frankia* strains. *Environ. Microbiol.* 2015; 17: 3125-3138.
8. Tisa LS, Oshone R, Sarkar I, Ktari A, Sen A *et al.* Genomic approaches toward understanding the actinorhizal symbiosis: An update on the status of *Frankia* genomes. *Symbiosis* 2016; 70: 5-16.
9. Udway DW, Gontang EA, Jones AC, Jones CS, Schultz AW *et al.* Significant natural product biosynthetic potential of actinorhizal symbionts of the genus *Frankia*, as revealed by comparative genomic and proteomic analyses. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 3617-3625.
10. Deicke M, Mohr JE, Roy S, Herzsprung P, Bellenger JP *et al.* Metallophore profiling of nitrogen-fixing *Frankia* spp. to understand metal management in the rhizosphere of actinorhizal plants. *Metallomics* 2019; 11: 810-821.
11. Wick R, Judd L, Gorrie C, Holt K. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* 2017; 13: e1005595.
12. Vallenet D, Calteau A, Cruveiller S, Gachet M, Lajus A *et al.* MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: D517-D528.
13. Normand P, Lapiere P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N *et al.* Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res.* 2007; 17: 7-15.
14. Griesmann M, Chang Y, Liu X, Spannagl M, Crook MB *et al.* Phylogenomics reveals multiple independent losses of the nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science* 2018; 361: 6398.
15. Parks D, Imelfort M, Skennerton C, Hugenholtz P, Tyson G. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 2015; 25: 1043-1055.
16. Tisa LS, Beauchemin N, Gtari M, Sen A, Wall LG. What stories can the *Frankia* genomes start to tell us? *J Biosci* 2013; 38: 719-726.
17. Nguyen L, Schmidt H, von Haeseler A, Minh B. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015; 32: 268-274.
18. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57: 81-91.
19. Oshone R, Hurst SC, Abebe-Akele F, Simpson S, Morris K *et al.* Permanent draft genome sequences for two variants of *Frankia* sp. strain Cpl1, the first *Frankia* strain isolated from root nodules of *Comptonia peregrina*. *Genome Announc* 2016; 4.
20. Normand P, Nouioui I, Pujic P, Fournier P, Dubost A *et al.* *Frankia canadensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Alnus incana* subspecies *rugosa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018; 10.1099/ijsem.0.002939.
21. Gtari M, Ghodhbane-Gtari F, Nouioui I, Ktari A, Hezbri K *et al.* Cultivating the uncultured: growing the recalcitrant cluster-2 *Frankia* strains. *Sci. Rep.* 2015; 5: 13112.
22. Nguyen TV, Wibberg D, Battenberg K, Blom J, Vanden Heuvel B *et al.* An assemblage of *Frankia* Cluster II strains from California contains the canonical *nod* genes and also the sulfotransferase gene *nodH*. *BMC Genomics* 2016; 17: 796.

23. Persson T, Benson DR, Normand P, Vanden Heuvel B, Pujic P *et al.* Genome sequence of "Candidatus Frankia daticae" Dg1, the uncultured microsymbiont from nitrogen-fixing root nodules of the dicot *Datisca glomerata*. J Bacteriol 2011; 193: 7017-7018.
24. Wall LG, Beauchemin N, Cantor MN, Chaia E, Chen A *et al.* Draft genome sequence of *Frankia* sp. strain BCU110501, a nitrogen-fixing actinobacterium isolated from nodules of *Discaria trinevis*. Genome Announc 2013; 1: e00503-00513.
25. Nouioui I, Beauchemin N, Cantor MN, Chen A, Dettler JC *et al.* Draft Genome Sequence of *Frankia* sp. Strain BMG5.12, a Nitrogen-Fixing Actinobacterium Isolated from Tunisian Soils. Genome Announc 2013; 1.
26. Nouioui I, Gtari M, Goker M, Ghodhbane-Gtari F, Tisa LS *et al.* Draft Genome Sequence of *Frankia* Strain G2, a Nitrogen-Fixing Actinobacterium Isolated from *Casuarina equisetifolia* and Able To Nodulate Actinorhizal Plants of the Order Rhamnales. Genome Announc 2016; 4.
27. Ghodhbane-Gtari F, Beauchemin N, Bruce D, Chain P, Chen A *et al.* Draft genome sequence of *Frankia* sp. strain CN3, an atypical, noninfective (Nod-) ineffective (Fix-) isolate from *Coriaria nepalensis*. Genome Announc 2013; 1: e0008513.
28. Nouioui I, Gueddou A, Ghodhbane-Gtari F, Rhode M, Gtari M *et al.* *Frankia asymbiotica* sp. nov., a non-infective actinobacterium isolated from *Morella californica* root nodule. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017; doi: 10.1099.

## Article 4

# INCIDENCE OF BACTERIAL GROUPS ORIGINATING FROM URBAN RUNOFFS AND ARTIFICIAL INFILTRATION SYSTEMS ON AQUIFER MICROBIOME COMMUNITY STRUCTURES

Colin Y<sup>1</sup>, Marjolet L<sup>1</sup>, Bouchali R<sup>1</sup>, Marti R<sup>1</sup>, Vautrin F<sup>1,2</sup>, Voisin J<sup>1,2</sup>, Bourgeois E<sup>1</sup>, Rodriguez-Nava V<sup>1</sup>, Blaha D<sup>1</sup>, Winiarski T<sup>2</sup>, Mermillod-Blondin F<sup>2</sup>, Cournoyer B<sup>1</sup>

1. UMR CNRS 5557, INRA 1418, VetAgro Sup, Ecologie Microbienne, Université Lyon-1, Lyon, France

2. UMR CNRS 5023, ENTPE, Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Vaulx-en-Velin, France

*Publié dans Hydrology and Earth System Sciences*

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>





L'urbanisation a entraîné une forte imperméabilisation des surfaces ainsi qu'un étalement des villes, ce qui a conduit à la saturation des réseaux unitaires d'eaux usées (Barnes *et al.*, 2001). Les inondations récurrentes des centres villes ainsi que la pollution des milieux naturels récepteurs lors d'événements pluvieux ont fait apparaître la nécessité d'améliorer la gestion des eaux usées en ville. Il a ainsi été décidé de séparer les eaux usées des eaux pluviales alors considérées comme propres (Pitt *et al.*, 1999). Cependant, la pression exercée sur les milieux naturels récepteurs par ces pratiques d'infiltration d'eaux pluviales n'est pas encore pleinement connue (Mc Grane *et al.*, 2016 ; Mejia & Moglen, 2009).

L'activité humaine émet de nombreux polluants tels que les HAP, PCB, pesticides ou métaux lourds qui ont un impact direct sur la santé humaine car ils sont généralement classés en tant que cancérogènes ou perturbateurs endocriniens (Chong *et al.*, 2013 ; Vezzaro & Mikkelsen, 2012). Ces polluants ont également une incidence sur la composition des communautés bactériennes du sol, notamment en favorisant le développement de microorganismes capables de les décomposer (Alvarez *et al.*, 2017). Parmi ces microorganismes se trouvent des bactéries pathogènes opportunistes appartenant notamment aux phyla des Protéobactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Aeromonas caviae* (Favre-Bonté *et al.*, 2005) ou des Actinobactéries (Khan *et al.*, 1997; Nhi-Cong *et al.*, 2010) telles que *Mycobacterium canettii* ou *N. cyriacigeorgica* (Quatrini *et al.*, 2008).

Lorsqu'un milieu naturel subit une perturbation, il peut être suivi par la communauté scientifique afin de d'évaluer l'incidence de cette perturbation sur les communautés bactériennes et ainsi apprécier sa résilience. Pour l'heure, toutes les études visant à évaluer la diversité bactérienne dans l'environnement se font soit par méthode culturale, soit par biologie moléculaire à l'aide du marqueur de l'ARNr 16S, également appelé *rrs* (Deiner *et al.*, 2017). Cependant, ce marqueur moléculaire se limite à une identification à l'échelle du genre bactérien et ne peut que rarement aboutir à une identification à l'échelle de l'espèce (Marti *et al.*, 2017). Lorsque l'on souhaite étudier un groupe bactérien particulier (classe, ordre, famille, genre) mais que l'on souhaite une identification à l'espèce, il est nécessaire de proposer des marqueurs alternatifs plus spécifiques et résolutifs, *i.e.* capable de différencier plusieurs individus d'un même genre bactérien.

Dans un premier temps, nous proposons de réaliser un suivi des communautés bactériennes au cours du cycle de l'eau. Le but étant ici de voir si les pratiques de recharge des aquifères liées au bassins d'infiltrations entraînent des modifications notables de la communauté bactérienne, notamment en induisant un enrichissement en bactéries pathogènes opportunistes. Pour cela, le bassin versant d'une zone d'activité de l'Est lyonnais a été choisie (Chassieu). Des échantillons d'eaux pluviales ont été collectés tout au long d'un continuum, depuis leur point de collecte (*i.e.* la chaussée) jusque dans l'aquifère en passant par le bassin de rétention/infiltration. A l'aide d'une méthode statistique Bayésienne de source tracking, le cheminement des bactéries au fil de l'eau a pu être suivi par metabarcoding à l'aide du marqueur de l'ARNr 16S. Un second marqueur, *tpm* proposé pour la première fois

dans cet article, est proposé afin de suivre des communautés de Protéobactéries présentant une résistance à la thiopurine méthyltransférase, *i.e.* des indicateurs de pollution médicamenteuse entre autres. Parmi ces bactéries se trouvent aussi des pathogènes opportunistes telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Aeromonas caviae*.

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



Hydrology and  
Earth System  
Sciences  
Discussions



# 1 Coalescence of bacterial groups originating from urban runoffs 2 and artificial infiltration systems among aquifer microbiomes

3 Yannick Colin<sup>1‡</sup>, Rayan Bouchali<sup>1</sup>, Laurence Marjolet<sup>1</sup>, Romain Marti<sup>1</sup>, Florian Vautrin<sup>1,2</sup>, Jérémy Voisin<sup>1,2</sup>,  
4 Emilie Bourgeois<sup>1</sup>, Veronica Rodriguez-Nava<sup>1</sup>, Didier Blaha<sup>1</sup>, Thierry Winiarski<sup>2</sup>, Florian Mermillod-Blondin<sup>2</sup>  
5 and Benoit Cournoyer<sup>1</sup>

6 <sup>1</sup>University of Lyon, UMR Ecologie Microbienne Lyon (LEM), Research Team “Bacterial Opportunistic  
7 Pathogens and Environment”, University Lyon 1, CNRS 5557, INRA 1418, VetAgro Sup, 69680 Marcy L’Etoile,  
8 France.

9 <sup>2</sup>University of Lyon, UMR Laboratoire d’Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA),  
10 Université Lyon 1, CNRS 5023, ENTPE, 69622 Villeurbanne, France.

11 <sup>‡</sup> Present address : Normandie Université, UNIROUEN, UNICAEN, UMR CNRS 6143, Morphodynamique  
12 Continentale et Côtière, 76000 Rouen, France

13

14 **Running title:** Y. Colin et al.: Urban runoff bacteria among recharged aquifer

15 **Keywords:** Stormwater infiltration; Microbial contamination; Aquifer; Source-tracking; Biofilms

16

17 **Correspondence :** [yannick.colin@univ-rouen.fr](mailto:yannick.colin@univ-rouen.fr) / [benoit.cournoyer@vetagro-sup.fr](mailto:benoit.cournoyer@vetagro-sup.fr)

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



18 **Abstract.** The invasion of aquifer microbial communities by aboveground micro-organisms, a phenomenon  
19 known as community coalescence, is likely to be exacerbated in groundwaters fed by stormwater infiltration  
20 systems (SIS). Here, the incidence of this increased connectivity with upslope soils and impermeabilized surfaces  
21 was assessed through a meta-analysis of 16S rRNA gene libraries. Specifically, free-living and attached aquifer  
22 bacteria (i.e., water and biofilm samples) were characterized upstream and downstream a SIS, and compared with  
23 bacterial communities from watershed runoffs, detention and infiltration basins. A significant bacterial transfer  
24 was observed, with aquifer bacterial biofilms being largely made up of taxa occurring in aboveground sediments  
25 and urban runoffs (44 to 67% of the total reads). This coalesced biofilm community was rich in hydrocarbon  
26 degraders such as *Sphingobium* and *Nocardia*. The bacterial community of the downstream SIS aquifer waters  
27 showed similar coalescence with aboveground taxa (26.7-66.5%) but a higher number of taxa involved in the N-  
28 and S-cycles was observed. A DNA marker named *tpm* enabled a tracking of bacterial species from 24 genera  
29 including the *Pseudomonas*, *Aeromonas* and *Xanthomonas* among these communities. Reads related to the  
30 *Pseudomonas* were allocated to 50 species, of which 16 were found in the aquifer samples. *P. umsongensis* and *P.*  
31 *chengduensis* were inferred to be in higher proportions among the *tpm*-harboring bacteria, respectively, of the  
32 aquifer biofilms, and waters. Several of these aquifer species were found involved in denitrification but also  
33 hydrocarbon degradation (*P. aeruginosa*, *P. putida*, and *P. fluorescens*). Reads related to *Aeromonas* were  
34 allocated to 11 species but only those from *A. caviae* were recovered in the aquifer samples. DNA imprints  
35 allocated to the *X. axonopodis* phytopathogen were recorded in higher proportions among the *tpm*-harboring  
36 bacteria of the aquifer waters than aboveground samples. A coalescence of microbial communities from an urban  
37 watershed with those of an aquifer was thus observed, and recent aquifer biofilms were found dominated by runoff  
38 opportunistic taxa able to use urban C-sources from aboveground compartments.  
39



## 40 1 Introduction

41 Urbanization exerts multiple pressures on natural habitats and particularly on aquatic environments (Konrad and  
42 Booth, 2005; McGrane, 2016; Mejía and Moglen, 2009). The densification of urban areas, combined with the  
43 conversion of agricultural and natural lands into urban land-use, led to the replacement of vegetation and open  
44 fields by impervious urban structures (*i.e.* roads, rooftops, side-walks and parking lots) (Barnes et al., 2001). These  
45 impervious structures reduce the infiltration capacity of soils. They also exacerbate the speed and volume of  
46 stormwater runoff that favor soil erosion, flooding events, and affect adversely natural groundwater recharge  
47 processes (Booth, 1991; Shuster et al., 2005). Due to these consequences, stormwater infiltration systems (SIS) or  
48 managed aquifer recharged systems (MAR) have been developed during the last decades, and are gaining more  
49 interest in developed countries (Pitt et al., 1999). Such practices reduce direct stormwater discharges to surface  
50 waters and alleviate water shortages (Barba et al., 2019; Dillon et al., 2008; Marsalek and Chocat, 2002). However,  
51 stormwater represents a major source of nonpoint pollution, and its infiltration into the ground may have adverse  
52 ecological and sanitary impacts (Chong et al., 2013; Pitt et al., 1999; Vezzaro and Mikkelsen, 2012).

53 The vadose zone of a SIS can act as a natural filter towards pollutants (hydrocarbons and heavy metals), and  
54 micro-organisms washed-off by runoffs (e. g. Murphy and Ginn, 2000; Tedoldi et al., 2016). Nevertheless, the  
55 effectiveness of SIS in preventing the migration of contaminants towards aquifers is not always optimal (Borchardt  
56 et al., 2007; Lapworth et al., 2012; Arnaud et al., 2015; Voisin et al., 2018). The filtering properties of SIS are  
57 influenced by various abiotic factors such as the nature of the media (rocks, sand and other soil elements), the  
58 physical properties (e. g. granulometry, hydrophobicity index, organization), and the runoff water flow velocity  
59 (Lassabatere et al., 2006; Winiarski et al., 2013). These constraints will impact water transit time from the top  
60 layers to the aquifer, but also the biology of these systems including the plant cover and root systems, worms and  
61 microbiota (Barba et al., 2019; Bedell et al., 2013; Crites, 1985; Pignneret et al., 2016). The thickness of the vadose  
62 zone was found to be one of the key parameters explaining chemical transfers such as phosphate and organic-  
63 carbon sources (Voisin et al., 2018). The situation is much less clear regarding the microbiological communities  
64 that flow through these systems (e. g. Barba et al., 2019; Voisin et al., 2018).

65 According to the microbial community coalescence concept conceptualized by Tikhonov, (2016) and adapted  
66 to riverine networks by Mansour et al. (2018), urban aquifers fed by SIS should harbor microbiota reflecting the  
67 coalescence (community assemblages and selective sorting) of aboveground microbial communities with those of  
68 the aquifer. Indeed, during rain events, microbial communities will be re-suspended through runoff-driven surface  
69 erosion processes, favoring detachment of micro-organisms from plant litter, wastes, soil, and other particles.  
70 These re-suspended communities will merge and generate novel assemblages. The resulting community will  
71 initially match the relative contributions of the various sub-watersheds to the overall microbiological complexity  
72 of the assemblages. The prevailing ecological constraints among the downward systems will then gradually drive  
73 this coalescence towards the most fit community structures. These resulting communities might be highly efficient  
74 at degrading urban pollutants trapped among a SIS but could also disturb the ecological equilibria of the connected  
75 and more sensitive systems like those of deep aquifers.

76 Here, the study explored the impact of a SIS, with a thick vadose zone (> 10 m), on the coalescence of urban  
77 runoff microbial communities in a connected aquifer. The tested hypotheses were that (1) highly specialized taxa  
78 (often termed K-strategists e. g. Vadstein et al., 2018) of an aquifer should outcompete the intrusive community  
79 members of aboveground taxa but (2) nutrient inputs from runoffs and pollutants could also drive changes among



these communities and favour environmental opportunists (often termed r-strategists e. g. Vadstein et al., 2018). The targeted SIS is part of a long-term experimental site (<http://www.graie.org/portail/dispositifsderecherche/othu/>) for which physico-chemical and biological monitorings have been implemented. It is connected to the eastern aquifer of Lyon (France) which is fed by three low hydraulic conductivity corridors ( $10^{-5}$ – $10^{-8}$  m s<sup>-1</sup>) separated by moraine hills (Foulquier et al., 2010). It has an average vadose zone thickness of 15 m, and the delay between a rainfall event and the impact on the aquifer waters was estimated at 86±11h (Voisin et al., 2018). A large DNA meta-barcoding dataset was built for this site, in order to investigate bacterial community coalescence from top compartments among the connected aquifer waters but also biofilm communities developing on inert surfaces. This investigation was built on the hypothesis that a less significant microbial community coalescence was likely to be observed among aquifer water samples than biofilms. This is supported by previous reports which suggested the occurrence of transient free-living bacteria among aquifers acting as a traveling seed bank (Griebler et al., 2014). More precisely, water grab samples were found to give access to snapshots of the diversity found among an aquifer (Voisin et al., 2018) while aquifer biofilms developing on artificial surfaces (clay beads) have been shown to be more integrative and informative of the groundwater microbiological quality (Mermillod-Blondin et al., 2019). Clay bead biofilms were found to capture the most abundant aquifer taxa, and taxa that could not be detected from grab samples. A field based investigation was thus performed to further explore the relative contributions of a set of sources such as runoffs and urban soils on the observed biofilm assemblages recovered from an aquifer. A Bayesian methodology, named SourceTracker (Knights et al., 2011), was used to investigate community coalescence from 16S rRNA gene – based DNA meta-barcoding datasets. To go deeper into these inferences, complementary datasets were built from an additional DNA marker named *tpm* (encoding EC:2.1.1.67 which catalyzes the methylation of thiopurine drugs) (Favre-Bonté et al., 2005). This genetic marker enables finer taxonomic allocations down to the species level, and allowed gaining further insights on the coalescence of a set of waterborne bacterial species and sub-species, including plant and human pathogens, with the aquifer microbial community.

## 2 Material and Methods

### 2.1 Experimental site

The Chassieu urban catchment is located in the suburbs of Lyon (France). It has a surface of 185 ha and hosts mainly industrial and commercial activities (*i.e.* wholesaling, recovery and waste management, metal surface treatment, car wash and repair services). The imperviousness coefficient of the catchment area is about 75 %. Stormwater and dry weather flows from industrial activities are drained by a network separated from the sewer. This network transfers waters into the Django-R SIS, which is part of the OTHU long term experimental observatory dedicated to urban waters (<http://www.graie.org/othu/>). This SIS contains an open and dry detention basin (DB) (32,000 m<sup>3</sup>), built on a concrete slab, with edges impermeabilized by a thick plastic lining. This DB allows a settling of coarse and medium size particles, resulting in sedimentary deposits which favor development of a plant cover. The DB water content is delivered within 24h into an infiltration basin (IB) (61,000 m<sup>3</sup>), which favors the recharge of the connected aquifer (AQ). This infiltration basin had a vadose zone of about 11 m during the experiments, and its geology, hydrology, ecology and pollution levels have been deeply investigated e. g. Barraud et al. (2002); Le Coustumer and Barraud (2007).



The Chassieu watershed, the Django-R SIS, and the Lyon aquifer were considered for this study (Figure 1, Table S1). Watershed runoff waters (hereafter WS) have been collected from sampling points spread over the catchment (21 sub-watersheds over three sampling periods,  $n=64$  samples). Sediments from the detention basin (hereafter DB) have been recovered from 50 cm<sup>2</sup> area covering the full sediment column down to the concrete slab of the DB ( $n=20$  samples). These sediments (or urban soils) often had an herbaceous plant cover, and were sampled in four areas defined according to the hydrological forces prevailing in the basin (e. g. Marti et al., 2017; Sébastien et al., 2014). Infiltration basin soil samples (hereafter IB) had been collected from 3 main zones (the area receiving the inflow waters, the bottom area of the basin, and an upper zone of the basin exposed to inflow waters only during strong rain events) ( $n=5$  samples per zone), at a 0-10 cm depth covering a surface of 50 cm<sup>2</sup>. The aquifer samples have been recovered from piezometers located upstream (up, in a zone of the aquifer not influenced by water recharge) and downstream (dw, in a zone of the aquifer influenced by water recharge) of the SIS of the Django-R site at a depth of 2 m below the water table (e. g. Barraud et al., 2002; Voisin et al., 2018) (Fig. 1). Groundwater samplings ( $n=6$ ; named AQ\_wat) had been performed with an immersed pump, used at a pumping rate of 6–8 L/min (PP36 inox, SDEC, Reignac-sur-Indre, France), and previously cleaned with 70% ethanol. The first 50 L were used to rinse the sampling equipment and discarded. The following 6 L were used for the microbiological analyses. The biofilm samples (AQ\_bio) from the aquifer were recovered using clay beads incubated in the aquifer over 10 days using the same piezometers as those used for the aquifer water samplings ( $n=6$  samples). Clay beads were used as physical matrix to sample groundwater biofilms according to Voisin et al. (2016).

## 2.2 PCR products DNA sequencings

Sequencing of the V5-V6 16S rRNA gene (*rrs*) PCR products were performed by the MrDNA company (Shallowater, TX, USA) with Illumina MiSeq technology and using the primers set 799F-1193R. The *tpm* DNA libraries were generated using the following mix of degenerated primers: ILMN-PTCF2 (GTGCCGYTRTGYGGCAAGA), ILMN-PTCR2 (ATCAKYGCGGCGGGTCRTA), ILMN-PTCF2m (GTGCCCYTRTGYGGCAAGT), and ILMN-PTCR2m (ATGAGBGCTGCCCTGTCRTA) as suggested by Favre-Bonté et al. (2005). PCR reactions were performed under the following conditions: (1) a hot start at 94°C for 3 min, (2) 35 cycles consisting of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s, and (3) a final extension of 5 min at 72°C. The PCR products were sequenced by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France) using the Illumina MiSeq technology. The 16S rRNA and *tpm* gene sequences are available at the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>).

## 2.3 Bioinformatic analyses

All MiSeq sequences were processed using Mothur (v.1.40.4) (Schloss et al., 2009) following the standard operating procedure developed by Kozich et al. (2013). For the 16S rRNA (*rrs*) gene sequences, reads were filtered for length (>300bp), quality score (mean,  $\geq 25$ ), number of ambiguous bases (=0), and length of homopolymer runs (<8) using the trim.seqs script in Mothur, and singletons were discarded. The 16S rRNA gene sequences passing these quality criteria were aligned to the SILVA reference alignment template (release 128) and an 80% bootstrap P-value threshold was used for taxonomic assignments. Chimeric sequences were identified using the chimera.uchime command and removed. To avoid any biases related to sequencing depth, a subsampling-based normalization was applied (20,624 sequences per sample) and the normalized dataset was used for all downstream



analyses. Operational Taxonomic Units (OTUs) were defined using a 97% identity cut-off. FAPROTAX (Louca et al., 2016) functional inferences were performed on the MACADAM Explore web site (<http://macadam.toulouse.inra.fr/>) according to Le Boulch et al. (2019). For the *tpm* gene sequences, chimeric sequences, primers, barcodes were removed, and the dataset was limited to sequences of a minimum length of 210 bp (average length=215 bp). The number of sequences was then normalized between the samples (4,636 sequences per sample) and Operational Taxonomic Units (OTUs) were defined with a 100% identity cut-off. The “BD\_TPM\_Mar18\_v1.unique\_770seq” database (<http://www.graie.org/othu/donnees>) was used to classify the sequences using the “Wang” text-based Bayesian classifier (Wang et al., 2007) and a P-bootstrap value above 80%. Local Blast analyses were performed on the “BD\_TPM\_Mar18\_v1.unique\_770seq” database using the NCBI BLASTX program in order to check the quality of the taxonomic affiliations.

#### 2.4 Statistical analyses

All statistical analyses were carried out in R (v.3.5.1). For the 16S rRNA gene sequences, alpha-diversity estimates were computed using the function “rarefy” from the ‘Vegan’ package (Oksanen et al., 2015). Richness ( $S_{obs}$ ) was computed as the number of observed OTUs in each sample. The diversity within each individual sample was estimated using the non-parametric Shannon index. To estimate whether the origin of the samples influenced the alpha-diversity, an ANOVA with Tukey’s post-hoc tests was performed for each index. Shared and unique OTUs were depicted in Venn-diagrams with the “limma” package (Ritchie et al., 2015). Concerning the beta-diversity between samples, a neighbor-joining tree was constructed with a maximum-likelihood approximation method using FastTree (Price et al., 2009). Weighted UniFrac distances were calculated for all pairwise OTU patterns according to Lozupone et al. (2011). Based on the distance matrices, Principal Coordinates Analysis (PCoA) (Anderson and Willis, 2003) were used to determine changes in the bacterial community structure from the watershed down to the aquifer. Permutation tests of distances (PERMANOVA) (Anderson, 2001) were performed using the “vegan” package (Oksanen et al., 2015), in order to establish the significance of the observed groupings.

#### 2.5 Bacterial community coalescence analyses

The SourceTracker computer package (Knights et al., 2011) was used to investigate community coalescence. SourceTracker is a Bayesian approach built to estimate the most probable proportion of user-defined “source” OTU in a given “sink” community. In the present analysis, various scenarios of community coalescence were investigated such as the coalescence of bacterial taxa from the watershed runoff waters and sediments from the detention and infiltration basins, with those of the downstream SIS aquifer water samples or of recent biofilms developing on clay beads incubated in the aquifer. SourceTracker was run with the default parameters (rarefaction depth 1000, burn-in 100, restart 10) to identify sources explaining the OTU patterns observed among the aquifer samples (waters and clay bead biofilms,  $n=12$ ). Alpha values were tuned using cross-validation ( $\alpha_1 = 0.001$  and  $\alpha_2 = 1$ ). The relative standard deviation (RSD) based on three runs was used as a gauge to evaluate confidence on the computed values (Henry et al., 2016; McCarthy et al., 2017).

### 3. Results

#### 3.1 16S rRNA V5-V6 gene sequences distribution biases and profilings

The analysis of the 16S rRNA V5-V6 gene libraries yielded 2,124,272 high-quality sequences distributed across 103 samples. Subsampling-based normalization was applied (20,624 reads per sample) and sequences were





distributed into 10,231 16S rRNA gene OTUs at a 97 % threshold. The rarefaction curves indicated that the sequencing depth was sufficient to cover bacterial diversity (Figure S1). At all sampling sites, bacterial communities were dominated by Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria (WS=95.1% of total reads, DB=84.3%; IB=71.4%; AQ\_bio=98.8% and AQ\_wat=58.6%), but 10 other phyla with relative abundances superior to 0.5% were also detected (Figure 2A and Table S2). Alpha-diversity estimates showed that aquifer samples harbored a microbiome with a significantly lower richness (AQ\_bio:  $S_{obs}=278 \text{ OTUs} \pm 106$  and AQ\_wat:  $S_{obs}=490 \text{ OTUs} \pm 333$ ) and a less diverse bacterial community (AQ\_bio:  $H'=2.9 \pm 0.3$  and AQ\_wat:  $H'=4.3 \pm 0.7$ ) than the ones of the upper compartments ( $S_{obs-WS}=1,288 \text{ OTUs} \pm 232$ ;  $S_{obs-DB}=1,566 \text{ OTUs} \pm 245$ ,  $S_{obs-IB}=1,503 \text{ OTUs} \pm 177$  and  $H'_{WS}=5.0 \pm 0.5$ ;  $H'_{DB}=5.4 \pm 0.5$ ,  $H'_{IB}=5.7 \pm 0.4$ ) (ANOVA,  $p<0.001$ ) (Figure 2B and Table S3). Among the surface samples, a greater diversity was observed among the soil samples from the infiltration basin than from samples of watershed runoff waters and sediments of detention basin (ANOVA,  $p<0.05$ ). In the aquifer, water grab samples were more diverse and showed higher 16S rRNA gene OTU contents than biofilms recovered from clay beads incubated for a 10-day period (ANOVA,  $p<0.05$ ) (Figure 2B and Table S3).

The structure of bacterial communities inferred from V5-V6 16S rRNA gene sequences changed markedly along the watershed down the aquifer. A PCoA ordination of the OTU profiles based on weighted Unifrac distances revealed that samples clustered according to their compartment of origin (*i.e.* WS, DB, IB, AQ\_bio and AQ\_wat) (Figure 3). These changes in community structures between compartments were supported by PERMANOVA statistical tests ( $F=20.7$ ,  $P<0.001$ ). Bacterial communities per compartment were found to be made of core and flexible (defined as not conserved between all sampling periods) bacterial taxa. Within a same compartment, similarities between bacterial community profiles ranged from 64.9% (AQ\_wat) to 82.0% (IB), while similarities across compartments ranged from 47.8% (DB vs AQ\_bio) to 65.9% (DB vs IB) (Figure S2). Bacterial community profiles of the aquifer waters were found closer to the ones of the detention basin deposits (57.5%) and soils of the infiltration basin (61.4%) than those of the aquifer biofilms (47.8 and 49.2%, respectively). However, more than 89% of the 16S rRNA gene OTUs ( $n=8,284$ ) identified above the aquifer (WS, DB and IB) were not detected in groundwater samples (AQ\_bio and AQ\_wat) (Figure S3). This large group of OTUs was made of minor taxa which accounted for 37.1%, 44.3% and 47.3% of the total reads recovered from the WS, DB and IB samples, respectively.

### 3.2 Coalescence of surface and aquifer bacterial communities

A SourceTracker analysis was performed to estimate the coalescence of V5-V6 16S rRNA gene OTUs from the watershed and SIS down into the aquifer waters and biofilm bacterial communities. This analysis indicated significant coalescence between the bacterial communities of the runoffs, the soils of the SIS, and the aquifer samples. The aquifer water microbial community upstream the SIS was found to explain between 0.02%-12.6% of the downstream water microbial community (Table 2), while OTUs from the runoff waters were found to explain 23 to 59% of the observed patterns (Table 2). OTUs from the infiltration basin explained 0.8-3.8% of the observed diversity among the SIS impacted aquifer community, and, those of the detention basin, between 0.02 and 9% of the community. The aquifer biofilm bacterial communities were also found to be assemblages of communities from the surface environments. The origin of more than 90% of the SIS impacted aquifer biofilms could be explained. Main sources were the runoff waters (33%), the sediments of the detention basin (20%), and the upstream aquifer waters (39%) (Table 2). Soils from the infiltration basin did not appear to have contributed much to taxa recovered from these aquifer biofilms (<4%) (Table 2). Content of the aquifer biofilms recovered upstream the SIS showed similar origins with a high proportion related to those observed among the runoff waters



(64%) and the aquifer waters (30%). This was not considered surprising because runoff infiltration can occur in several sites upstream of the SIS (even though no direct relation with other SIS were made).

### 3.3. 16S rRNA gene inferred bacterial taxa undergoing coalescence in the aquifer

In order to identify the bacterial taxa involved in the coalescence process, OTUs of the 16S rRNA gene dataset were allocated to taxonomic groups using the SILVA reference alignment template. These taxonomic allocations indicated that (1) 14 genera were only recorded in the aquifer samples, (2) 421 genera were only recorded in the upper surface compartments of the watershed, and (3) 219 were recorded among aboveground and aquifer compartments (Table S4). The following bacterial genera were exclusively associated to the aquifer bacterial communities: *Turicella*, *Fritschea*, *Metachlamydia*, *Macrococcus*, *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Abiotrophia*, *Dialister*, *Leptospirillum*, *Omnitrophus*, *Campylobacter*, *Sulfurimonas*, *Haemophilus*, *Nitratireductor*. These bacterial genera were recovered from all water samples while 5 were also detected in biofilms (Table S4). These genera were associated to 926 16S rRNA gene OTUs that accounted for 48.0% and 1.8% of total reads recovered from aquifer waters and aquifer biofilms developing on clay beads, respectively. FAPROTAX functional inferences indicated some of these genera to be host-associated such as *Fritschea*, *Metachlamydia*, *Finegoldia*, *Campylobacter* and *Haemophilus*, with the latter two being well-known to contain potential pathogens. *Campylobacter* and *Sulfurimonas* cells have also been associated with nitrogen and sulfur respiration processes, and *Leptospirillum* with nitrification.

Regarding the bacterial taxa of the aboveground communities matching those of the aquifer samples, a total of 1,021 16S rRNA gene OTUs was found to be shared between these compartments (Table 1 and Figure S3). These OTUs consisted of abundant taxa as they accounted for 9.7-39.4% of the total reads for the samples recovered from the surface compartments, and for 33.6-83.4% and 95.0-99.4% of the total reads of the water and biofilm aquifer samples, respectively. The  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria dominated this group. It is noteworthy that aquifer samples collected upstream of the SIS shared less OTUs with the surface compartments (125 OTUs  $\pm$  41) than samples under the influence of the infiltration system (332 OTUs  $\pm$  85) (Table 1). The shared OTUs between aquifer samples and the upper compartments represented a higher fraction of bacterial communities in samples recovered downstream the SIS (81.3%  $\pm$  22.8 of total reads) compared to those collected upstream (68.9%  $\pm$  30.9 of total reads) (Table 1). Reads from *Pseudomonas*, *Nitrospira*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Flavobacterium* were the most abundant (>1%) of the shared OTUs recovered in the aquifer water samples, while those allocated to *Pseudomonas*, *Duganella*, *Massilia*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Aquabacterium*, *Novosphingobium*, *Sphingobium*, *Perlicidibaca*, *Meganema* were the most abundant (>1%) among the aquifer biofilms (Table S4). Most of these aquifer water taxa (except *Streptococcus*) were found involved in denitrification or nitrification as inferred from FAPROTAX. The biofilm taxa were more often associated with hydrocarbon degradation (*Novosphingobium*, *Sphingobium*, and *Nocardia*) by FAPROTAX. Several of these biofilm bacterial genera were also found to be likely containing potential human pathogens (*Duganella*, *Massilia*, *Nocardia*, and *Aquabacterium*) by FAPROTAX (and published clinical records). A set of 14 potentially hazardous bacterial genera was selected from Table S4, and used to illustrate the coalescence of bacterial taxa among the aquifer samples on Fig. 4. The 16S rRNA gene reads from *Flavobacterium* prevailed in all upper compartments (WS=6.9% of total reads, DB=13.4% and IB=8.3%) and were in significant numbers among the connected aquifer (AQ\_wat = 1.1% and AQ\_bio = 3.1%) (Figure 4B and Table S4C). *Pseudomonas* 16S rRNA gene reads were in relatively lower numbers



in the upper compartments (WS = 0.4% of total reads, DB = 0.4% and IB < 0.05%) but increased in the aquifer samples (AQ\_wat = 8.4% and AQ\_bio = 35.5%) (Figure 4B and Table S4). Similar trends were observed for *Nocardia* and *Neisseria* OTUs (Figure 4B). It is to be noted that OTUs exclusively recovered from the upper compartments were mainly part of the *Gemmatimonas* (0.2-1.6% of total reads), *Geodermatophilus* (0.1-1.8%) and *Roseomonas* (0.1-1.0%) (Table S4).

### 3.4 Coalescence of *Pseudomonas* and other *tpm*-harboring bacterial species

DNA sequences from *tpm* PCR products generated according to Favre-Bonté et al. (2005) allowed a deeper analysis of the bacterial species undergoing a coalescence with the aquifer microbiome. A total of 19,129 *tpm* OTUs was identified among the samples (from datasets re-sampled to reach 4,636 reads per sample). As expected, these *tpm* reads were mainly assigned to the *Proteobacteria* (WS = 91.7% of total reads, DB = 86.5%; IB = 76.3%; AQ\_wat = 82.9% and AQ\_bio = 85.0%), but some reads could also be attributed to the *Bacteroidetes*, *Nitrospirae* and *Cyanobacteria* (Table S5). These taxonomic allocations allowed the identification of 24 bacterial genera and 91 species whose distributions are summarized in Tables S6 and S7. The *tpm* sequences were mainly allocated to the *Pseudomonas* (WS = 35.5% of total reads, DB = 27.2%; IB = 7.3%; AQ\_wat = 51.4% and AQ\_bio = 47.6%), *Aeromonas* (WS = 0.8% of total reads, DB = 2.7%; IB < 0.05%; AQ\_wat = 0.07% and AQ\_bio < 0.05%), *Xanthomonas* (WS = 4.4% of total reads, DB < 0.05%; IB = 1.3%; AQ\_wat = 8.3% and AQ\_bio < 0.05%), *Herbaspirillum* (WS = 10.74% of total reads) and *Nitrosomonas* (DB = 4.4% of total reads; IB = 0.23%) (Table S6). Reads related to *Pseudomonas* were allocated to 50 species, including pollutant-degraders (*P. pseudoalcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. alcaligenes*, *P. putida* and *P. fluorescens*), phytopathogens (*P. syringae*, *P. viridiflava*, *P. stutzeri*, and *P. marginalis*) and human opportunistic pathogens (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *S. acidaminiphila*) (Table S7). Reads related to the *Aeromonas* were attributed to 11 species but only reads allocated to *A. caviae* could be recovered from the aquifer and aboveground compartments (Table S7). Reads related to the *Xanthomonas* were allocated to 9 species but only those allocated to the *X. axonopodis/campestris* complex and *X. cannabis* species were recovered from the aquifer and upper compartments (Table S7). Regarding the *Pseudomonas*, *tpm* reads allocated to *P. jessenii*, *P. chlororaphis*, and *P. resinovorans* were restricted to the aquifer samples. Reads allocated to *P. aeruginosa*, *P. anguilliseptica*, *P. chengduensis*, *P. extremaustralis*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. gessardii*, *P. koreensis*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. umsongensis*, and *P. viridiflava*, were recovered from the aquifer and upper compartments (Table S7). FAPROTAX analysis indicated that a significant number of the species detected in the aquifer can be involved in denitrification (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *S. acidaminiphila*, *X. autotrophicus*, *P. chlororaphis*) or nitrification (*Nitrospira defluvii*, *Nitrosomonas oligotropha*) but also in hydrocarbon degradation (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*). Some were also suggested by FAPROTAX to be human pathogens or invertebrate parasites (e. g. *P. chlororaphis*). These functional inferences were in line with those obtained with the 16S rRNA gene dataset.

The *tpm* OTUs (representative of infra-specific complexes) shared between the upper compartments and the aquifer (Table 3 and Table S8) were allocated to 14 species and 5 genera (Table 3). Four of these OTUs led to higher relative numbers of reads in the aquifer samples, in the following decreasing order: *P. umsongensis* (Otu00005) > *P. chengduensis* (Otu00024) > *X. axonopodis/campestris* (Otu00019 & Otu00878) > *P. stutzeri* (Otu00119 & Otu10066). These co-occurrences of OTUs between aboveground and aquifer samples support the



hypothesis of significant coalescence between these bacterial communities. The other OTUs showed higher number of reads among the top compartments. The OTU allocated to *X. cannabis* showed the highest relative number of reads of this group among runoff waters. The distribution pattern of this OTU suggested a relative decline while moving down the aquifer. The *P. aeruginosa* Otu00066 was recovered in the runoff waters, and biofilms developing on clay beads incubated in the aquifer.

#### 4. Discussion

Urban microbial communities mobilized by runoffs will merge, after migration through a vadose zone, with aquifer communities. This coalescence will lead to novel microbial assemblages through selective species sorting. SIS are significantly contributing at the recharge of aquifers by runoff waters. They can receive large volumes of runoff waters that will contain significant amount of chemical pollutants but also microbial assemblages representative of the connected urban biomes. Here, the incidence of a SIS on the microbial assemblages observed among an aquifer was investigated. The structure and fate of such assemblages remain poorly investigated but must be better understood to assess the environmental and health risks related to stormwater infiltration practices (Abu-Ashour et al., 1994; Powelson et al., 1993; Redman et al., 2001). The tested hypotheses were that (1) highly specialized K-strategists of an aquifer should outcompete the intrusive community members of aboveground systems but (2) nutrient inputs from runoffs and pollutants could also drive changes among these communities and favour some environmental opportunists or r-strategists which are growing fast when significant energy sources are available. The genetic structure of coalesced aquifer communities should be representative of these trade-offs. Here, DNA meta-barcoding datasets were thus used to estimate the proportion of communities from sediments of a detention basin, soils of an infiltration basin, and runoff waters from a watershed that have merged with communities of an aquifer. Furthermore, taxonomic and functional inferences were performed in order to assess changes among the aquifer bacterial functional groups. A genetic marker named *tpm* was used to track species and particular sequence types of the *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, and a few other genera, from runoffs down into the SIS impacted aquifer. These trackings demonstrated the successful coalescence of some species like *P. umsongensis*, *P. chengduensis*, *X. axonopodis/campestris* and *P. stutzeri*.

Estimation of alpha-diversity indices from the 16S rRNA bacterial community profilings indicated that groundwater samples (*i.e.* waters and biofilms) harbored a less diverse microbiome than those of the top compartments (*i.e.* WS, DB, IB). A 2 to 5-fold reduction in bacterial richness was observed from the surface compartments down into the aquifer. This result suggests that a large proportion of bacterial taxa carried by stormwater runoffs or thriving in the detention/infiltration basins were retained and/or eliminated by the vadose zone filtration process. In fact, more than 89% of the 16S rRNA gene OTUs in the top compartments were not detected in the underground samples. This is in agreement with previous works which have shown that immobilization of micro-organisms through porous media are high in the top soil layers, and triggered by mechanical straining, sedimentation and adsorption (Kristian Stevik et al., 2004; Krone et al., 1958). Moreover, particles that accumulate as water passes through the soil can form a mat that can also enhance this straining process (Krone et al., 1958). Nevertheless, despite this filtering effect, infiltration has induced significant changes in the diversity of groundwater bacterial communities. Both water and biofilm aquifer samples recovered downstream the SIS had higher bacterial richness than those collected upstream. These diversity changes were found related to a coalescence of bacterial taxa from the top compartments with the aquifer microbial communities.



352 Indeed, downstream the SIS, aquifer water samples shared more OTUs (up to 47%) with those of the runoff waters  
353 than those upstream the SIS. Furthermore, aquifer biofilms downstream the SIS were heavily colonized by OTUs  
354 (90% of the datasets) from the top compartments.

355 The SourceTracker Bayesian probabilistic approach based on 16S rRNA gene meta-barcoding datasets  
356 (Knights et al., 2011) was applied to refine our understanding of the coalescence of microbial communities from  
357 aboveground environments down into an aquifer. These inferences revealed variable levels of coalescence in the  
358 SIS recharged aquifer depending upon the investigated sink *i.e.* waters or biofilms developing on clay beads  
359 incubated in the aquifer. Bacterial community structures of the groundwater samples (upstream and downstream  
360 the SIS) were significantly built from aboveground communities (*e. g.* those from runoff waters). However, the  
361 origin of a high proportion of the diversity observed among the aquifer waters downstream the SIS remained  
362 undefined. This is likely related to the emergence of novel biomes among the vadose zone of a SIS fed with urban  
363 waters and pollutants. These biomes would have emerged from the build-up of novel biotopes during the  
364 construction and functioning of the SIS. The prevailing environmental constraints and pollutants would then have  
365 favored minor taxa (not detectable by meta-DNA barcoding approaches) from the aboveground compartments. It  
366 is to be noted that functional inferences from the knowledge on bacterial genera suggested an occurrence of several  
367 aquifer taxa involved in the nitrogen and sulfur cycles. *Campylobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*,  
368 *Sulfurimonas* cells have been associated with nitrogen and sulfur respiration processes, and *Nitrospira* and  
369 *Leptospirillum* with nitrification. The oligotrophic nature of the aquifer waters (concentrations of biodegradable  
370 dissolved organic carbon < 0.5 mg/L, Mermillod-Blondin et al., 2015) is thus likely to have induced a significant  
371 selective sorting of microbial taxa among the merged community. Most abundant above ground taxa often require  
372 high energy (organic carbon) and nutrient levels to proliferate (Cho and Kim, 2000; Griebler and Lueders, 2009).

373 Similarly, a large part of the bacterial taxa identified from aquifer biofilms was attributed to aboveground  
374 sources by the SourceTracker approach. Indeed, watershed runoff waters and detention basin deposits were found  
375 to have significantly contributed to the build-up of the observed biofilm community structures. Aquifer waters  
376 collected upstream the SIS were also major contributors (11-46%) of taxa for these biofilm assemblages. These  
377 biofilms showed a high content of 16S rRNA gene sequences belonging to the  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria. According  
378 to the ecological concept of r/K selection, these proteobacteria are often considered as r-strategists, able to respond  
379 quickly to environmental fluctuations, and colonize more efficiently newly exposed surfaces than other groups of  
380 bacteria (Araya et al., 2003; Fierer et al., 2007; Lladó and Baldrian, 2017; Manz et al., 1999; Pohlen et al., 2010).  
381 Moreover, because they tend to concentrate nutrients (Flemming et al., 2016), biofilms are likely to favor the  
382 survival of opportunistic bacterial cells capable of exploiting spatially and temporally variable carbon and nutrient  
383 sources. Here, taxa recovered from aquifer biofilms were previously recorded to have the ability to use  
384 hydrocarbons as carbon- and energy sources *e. g.* *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*, and *Novosphingobium*.  
385 SIS and urban runoffs are well known to be highly polluted by such molecules (*e. g.*, Marti et al., 2017) and  
386 significant organic matter enrichments were detected in aquifers downstream to SISs (*e. g.* Mermillod-Blondin et  
387 al., 2015). The r/K selection ecological concept thus seems to apply to the community assemblages observed in  
388 this work. K-strategists would be the specialists described above which can perform well at densities close to the  
389 carrying capacity of the system, while the r-strategists would be environmental opportunists taking advantage of  
390 the newly available surfaces offered by the clay beads and the co-occurrence of aboveground C-sources.



391 Taxonomic allocations of the 16S rRNA OTUs suggested the aquifer waters and biofilms to likely harbor  
392 opportunistic human, plant and animal pathogens of the genus *Finegoldia*, *Campylobacter*, *Haemophilus*,  
393 *Duganella*, *Massilia*, *Nocardia*, *Aquabacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, and *Aeromonas*.  
394 Among these, the most striking results were the observed enrichment of 16S rRNA gene reads allocated to the  
395 *Nocardia* (about 4% of total reads) and *Pseudomonas* (about 35% of total reads) in the biofilms recovered from  
396 clay beads incubated downstream the SIS. *Nocardia* and *Pseudomonas* 16S rRNA gene sequences were in much  
397 lower relative proportions in the aboveground compartments. The genus *Pseudomonas* was previously found to  
398 be abundant under low flow conditions, and was often associated with biofilm formation (Douterelo et al., 2013).  
399 Moreover, pseudomonads are well-known for their ability at using hydrocarbons as energy and C-sources.  
400 Regarding the *Nocardia* cells, there is a poor knowledge of their ecology but a few reports indicated a tropism for  
401 hydrocarbon polluted urban soils and sediments (e. g., Bernardin-Souibgui et al., 2018; Sébastien et al., 2014).  
402 There was no additional approach to further investigate the molecular ecology of *Nocardia* cells found among the  
403 investigated urban watershed. However, a *tpm* meta-barcoding analytical scheme could be applied on DNA  
404 extracts investigated in this study in order to go deeper into the taxonomic allocations of the pseudomonads and  
405 some other *tpm*-harboring genera. The applied *tpm* meta-barcoding approach allowed an investigation of the  
406 coalescence of about 90 species among the investigated watershed including 50 species of *Pseudomonas*, 11  
407 species allocated to the *Aeromonas*, and some additional species allocated to the *Nitrospira*, *Nitrosomonas*,  
408 *Stenotrophomonas*, *Xanthobacter*, and *Xanthomonas*. A single *Aeromonas* species, *A. caviae*, was recorded among  
409 the above- and under-ground environments. More than 10 *Pseudomonas* species thriving in the recharged aquifer  
410 were detected among the aboveground compartments. *P. umsongensis* and *P. chengduensis* *tpm* OTUs were  
411 detected aboveground, and represented a significant fraction of the *tpm*-harboring bacteria retrieved from the  
412 aquifer samples. These two species were initially isolated from farm soil and landfill leachates (Kwon et al., 2003;  
413 Tao et al., 2014), further supporting the hypothesis that such soil-associated bacteria can be transferred from  
414 runoffs down to natural hydrosystems, and can merge with aquifer communities. Regarding the *Pseudomonas*  
415 species that may pose health threats to humans, a *tpm* OTU affiliated to *P. aeruginosa* was found to be shared  
416 between the surface compartments and the biofilm *tpm* community developing on clay beads incubated  
417 downstream the SIS. *P. aeruginosa* thus had the properties allowing an opportunistic development among the  
418 aquifer. This species is known for its metabolic versatility and ability to thrive on hydrocarbons. It would thus be  
419 part of the r-strategists that could get opportunistically established in aquifer biofilm communities impacted by  
420 urban pollutants. Apart from *P. aeruginosa*, the species *P. putida* and *P. stutzeri*, frequently detected in soils and  
421 wastewater treatment plants (e.g. Igbino et al., 2012; Luczkiewicz et al., 2015; Miyahara et al., 2010), were also  
422 recovered along the watershed and aquifer. However, although these two species were identified in human  
423 infections (Fernández et al., 2015; Noble and Overman, 1994), information about their virulence remains scarce.  
424 These species are therefore considered to be of less concern than *P. aeruginosa* and *A. caviae*, another  
425 opportunistic infectious agent (Antonelli et al., 2016). *P. putida* isolates have been shown involved in hydrocarbon  
426 degradation, and *P. stutzeri* to play part in the N-cycle either through denitrification or nitrogen-fixation.

## 427 5 Conclusions

428 The knowledge gained from the present study demonstrated that coalescence of microbial communities from an  
429 urban watershed with those of an aquifer can occur, and yield novel assemblages. Specialized bacterial

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



communities of aquifer waters were slightly re-shuffled by aboveground communities. However, the assemblages observed among recent aquifer biofilms were found dominated by opportunistic r-strategists coming from aboveground compartments, and often associated with the ability at degrading hydrocarbons e. g. the pseudomonads, *Nocardia* and *Novosphingobium* cells. The aquifer of the investigated site was found, for the first time, to be specifically colonized by species like *P. jessenii*, *P. chlororaphis*, and *P. resinovorans* but also undesirable human opportunistic pathogens such as *P. aeruginosa* and *A. caviae*. Artificial clay beads incubated in the aquifer through piezometers appeared highly efficient germcatchers to evaluate the ability of a SIS at preventing transfer of undesirable r-strategists down to an aquifer. The long term incidence of allochthonous bacteria on the integrity of aquifer microbiota remains to be investigated. Free-living communities are not likely to be much impaired but those developing as biofilms on inert surfaces might be. Microbial biofilms are key structures in the transformation processes of several elements and nutrients. They often display much higher cell densities than free-living populations (Crump and Baross, 1996; Crump et al., 1998; van Loosdrecht et al., 1990). Here, we have demonstrated that runoff and SIS bacterial taxa can colonize solid matrices of a deep aquifer. The next step is now to investigate whether native aquifer biofilm communities can resist to these repeated invasions by opportunistic r-strategists.

445

*Data availability.* The 16S rRNA gene sequences are available at the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena>) using the following accession numbers: PRJEB33510 (IB), PRJEB21348 (DB), PRJEB29925 (AQ), and PRJEB33507 (WS), and the *tpm* gene sequences using the PRJEB33622 accession number.

450

*Supplement.* The supplementary materials related to this article is available online at: <https://doi.org/>

452

*Author contribution.* BC coordinated the work. YC and BC designed the experiments. YC, VRN, TW, FMB, RB, LM, RM, FV, EB, DB, JV, and BC performed the experiments and contributed at the analysis of the datasets. YC and BC prepared the manuscript with contributions from all co-authors.

456

*Competing interests.* The authors declare that they have no conflict of interest.

457



<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



**Acknowledgments.** This work was partly funded by l'Agence Nationale de la Recherche through the ANR-16-CE32-0006 (FROG) and ANR-17-CE04-0010 (Infiltron) projects, by Labex IMU (Intelligence des Mondes Urbains), the Greater-Lyon Urban Community, the French national research program for environmental and occupational health of ANSES under the terms of project "Iouqmer" EST 2016/1/120, the School of Integrated Watershed Sciences H2O'LYON (ANR 17-EURE-0018), "Investissements d'avenir" program), the MITI CNRS project named Urbamic, and the Urban School of Lyon (ANR-17-CONV-0004). Authors thank the OTHU network for technical assistance and financial supports.

465

466 Edited by:  
467 Reviewed by:  
468

#### 469 References

- 470 Abu-Ashour, J., Joy, D.M., Lee, H., Whiteley, H.R., Zelin, S.: Transport of microorganisms through soil. *Water*  
471 *Air Soil Poll.*, 75, 141–158, <https://doi.org/10.1007/BF01100406>, 1994.
- 472 Anderson, M.J.: A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral. Ecol.*, 26, 32–46,  
473 <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>, 2001.
- 474 Anderson, M.J., Willis, T.J.: Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination  
475 for ecology. *Ecology*, 84, 511–525, <https://www.jstor.org/stable/3107905>, 2003.
- 476 Antonelli, A., D'Andrea, M.M., Montagnani, C., Bartolesi, A.M., Di Pilato, V., Fiorini, P., Torricelli, F., Galli, L.,  
477 Rossolini, G.M.: Newborn bacteraemia caused by an *Aeromonas caviae* producing the VIM-1 and SHV-12  $\beta$ -  
478 lactamases, encoded by a transferable plasmid. *J. Antimicrob. Chemother.*, 71, 272–274, <https://doi.org/10.1093/jac/dkv304>, 2016.
- 480 Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., Nasu, M.: Bacterial activity and community composition in stream  
481 water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis.  
482 *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, 111–119, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01050.x>, 2003.
- 483 Arnaud, E., Best, A., Parker, B.L., Aravena, R., Dunfield, K.: Transport of *Escherichia coli* through a thick vadose  
484 zone. *J. Environ. Qual.*, 44, 1424, <https://doi.org/10.2134/jeq2015.02.0067>, 2015.
- 485 Barba, C., Folch, A., Gaju, N., Sanchez-Vila, X., Carrasquilla, M., Grau-Martínez, A., Martínez-Alonso, M.:  
486 Microbial community changes induced by managed aquifer recharge activities: linking hydrogeological and  
487 biological processes. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 23, 139–154. <https://doi.org/10.5194/hess-23-139-2019>, 2019.
- 488 Barnes, K.B., Iii, J.M.M., Roberge, M.C.: Impervious surfaces and the quality of natural and built environments,  
489 Department of Geography and Environmental Planning. Towson University, 2001.
- 490 Barraud, S., Gibert, J., Winiarski, T., Bertrand Krajewski, J.-L.: Implementation of a monitoring system to measure  
491 impact of stormwater runoff infiltration. *Water Sci. Technol.*, 45, 203-210, [https://iwaponline.com/wst/article-](https://iwaponline.com/wst/article-pdf/45/3/203/425178/203.pdf)  
492 [pdf/45/3/203/425178/203.pdf](https://iwaponline.com/wst/article-pdf/45/3/203/425178/203.pdf), 2002.



<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



- 493 Bedell, J.-P., Mourier, B., Provot, J., Winiarski, T.: Influences on the establishment and dominance of vegetation  
494 in stormwater infiltration basins. *Water Sci. Technol.*, 68, 2576–2583, <https://doi.org/10.2166/wst.2013.526>,  
495 2013.
- 496 Bernardin-Souibgui, C., Barraud, S., Bourgeois, E., Aubin, J.-B., Becouze-Lareure, C., Wiest, L., Marjolet, L.,  
497 Colinon, C., Lipeme Kouyi, G., Cournoyer, B., Blaha, D.: Incidence of hydrological, chemical, and physical  
498 constraints on bacterial pathogens, *Nocardia* cells, and fecal indicator bacteria trapped in an urban stormwater  
499 detention basin in Chassieu, France. *Environ. Sci. Poll. Res.*, 25, 24860–24881,  
500 <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1994-2>, 2018.
- 501 Booth, D.B.: Urbanization and the natural drainage system-impacts, solutions, and prognoses. *The Northwest*  
502 *Environ. J.*, 7, 93–118, 1991.
- 503 Borchardt, M.A., Bradbury, K.R., Gotkowitz, M.B., Cherry, J.A., Parker, B.L.: Human enteric viruses in  
504 groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 6606–6612,  
505 <https://doi.org/10.1021/es071110+>, 2007.
- 506 Cho, J.-C., Kim, S.-J.: Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock  
507 wastewater input. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 956–965, <https://doi.org/10.1128/aem.66.3.956-965.2000>, 2000.
- 508 Chong, M.N., Sidhu, J., Aryal, R., Tang, J., Gernjak, W., Escher, B., Toze, S.: Urban stormwater harvesting and  
509 reuse: a probe into the chemical, toxicology and microbiological contaminants in water quality. *Environ.*  
510 *Monit. Assess.*, 185, 6645–6652. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-3053-7>, 2013.
- 511 Crites, R.W.: Micropollutant removal in rapid infiltration, in: *Artificial Recharge of Groundwater*. Butterworth  
512 Publishers, Boston, Massachusetts, pp. 579–608, 1985.
- 513 Crump, B., Baross, J.: Particle-attached bacteria and heterotrophic plankton associated with the Columbia River  
514 estuarine turbidity maxima. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 138, 265–273, 1996.
- 515 Crump, B.C., Simenstad, C.A., Baross, J.A.: Particle-attached bacteria dominate the Columbia River estuary.  
516 *Aquat. Microb. Ecol.*, 14, 7–18, 1998.
- 517 Dillon, P., Page, D., Vanderzalm, J., Pavelic, P., Toze, S., Bekele, E., Sidhu, J., Prommer, H., Higginson, S., Regel,  
518 R., Rinck-Pfeiffer, S., Purdie, M., Pitman, C., Wintgens, T.: A critical evaluation of combined engineered and  
519 aquifer treatment systems in water recycling. *Water Sci. Technol.*, 57, 753–762.  
520 <https://doi.org/10.2166/wst.2008.168>, 2008.
- 521 Douterelo, I., Sharpe, R.L., Boxall, J.B.: Influence of hydraulic regimes on bacterial community structure and  
522 composition in an experimental drinking water distribution system. *Water Res.*, 47, 503–516. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.053>, 2013.
- 524 Favre-Bonté, S., Ranjard, L., Colinon, C., Prigent-Combaret, C., Nazaret, S., Cournoyer, B.: Freshwater selenium-  
525 methylating bacterial thiopurine methyltransferases: diversity and molecular phylogeny. *Environ. Microbiol.*  
526 7, 153–164, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00670.x>, 2005.

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



- 527 Fernández, M., Porcel, M., de la Torre, J., Molina-Henares, M.A., Daddaoua, A., Llamas, M.A., Roca, A., Carriel,  
528 V., Garzón, I., Ramos, J.L., Alaminos, M., Duque, E.: Analysis of the pathogenic potential of nosocomial  
529 *Pseudomonas putida* strains. *Front Microbiol.* 6:871, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00871>, 2015.
- 530 Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B.: Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88, 1354–  
531 1364. <https://doi.org/10.1890/05-1839>, 2007.
- 532 Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S.: Biofilms: an emergent  
533 form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*, 14, 563–575, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>, 2016.
- 534 Foulquier, A., Malard, F., Mermillod-Blondin, F., Datry, T., Simon, L., Montuelle, B., Gibert, J.: Vertical change  
535 in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater:  
536 biological uptake or mixing? *Biogeochem.*, 99, 31–47, <https://doi.org/10.1007/s10533-009-9388-7>, 2010.
- 537 Griebler, C., Lueders, T.: Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biol.*, 54, 649–677,  
538 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x>, 2009.
- 539 Griebler, C., Malard, F., Lefébure, T.: Current developments in groundwater ecology—From biodiversity to  
540 ecosystem function and services. *Current Opinion Biotechnol.*, 27, 159–167, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.018>, 2014.
- 542 Henry, R., Schang, C., Coutts, S., Kolotelo, P., Prosser, T., Crosbie, N., Grant, T., Cottam, D., O'Brien, P., Deletic,  
543 A.: Into the deep: evaluation of SourceTracker for assessment of faecal contamination of coastal waters. *Water*  
544 *Res.*, 93, 242–253, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.029>, 2016.
- 545 Igbinosa, I.H., Nwodo, U.U., Sosa, A., Tom, M., Okoh, A.I.: Commensal *Pseudomonas* species isolated from  
546 wastewater and freshwater milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as reservoir of antibiotic  
547 resistant determinants. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9, 2537–2549,  
548 <https://doi.org/10.3390/ijerph9072537>, 2012.
- 549 Knights, D., Kuczynski, J., Charlson, E.S., Zaneveld, J., Mozer, M.C., Collman, R.G., Bushman, F.D., Knight, R.,  
550 Kelley, S.T.: Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat. Methods*, 8, 761,  
551 <https://doi.org/10.1038/nmeth.1650>, 2011.
- 552 Konrad, C.P., Booth, D.B.: Hydrologic changes in urban streams and their ecological significance, in: *American*  
553 *Fisheries Society Symposium*, 47, 157–177, 2005.
- 554 Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D.: Development of a dual-index  
555 sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina  
556 sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 5112–5120, <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>,  
557 2013.
- 558 Kristian Stevik, T., Kari Aa, Ausland, G., Fredrik Hanssen, J.: Retention and removal of pathogenic bacteria in  
559 wastewater percolating through porous media: a review. *Water Res.*, 38, 1355–1367,  
560 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.024>, 2004.
- 561 Krone, R.B., Orlob, G.T., Hodgkinson, C.: Movement of coliform bacteria through porous media. *Sewage Ind.*  
562 *Wastes*, 30, 1–13, 1958.

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



- 563 Kwon, S.W., Kim, J.S., Park, I.C., Yoon, S.H., Park, D.H., Lim, C.K., Go, S.J., *Pseudomonas koreensis* sp. nov.,  
564 *Pseudomonas umsongsensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in  
565 Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53, 21–27, <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02326-0>, 2003.
- 566 Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S.: Emerging organic contaminants in groundwater: A review of  
567 sources, fate and occurrence. Environ. Pollut. 163, 287–303, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>,  
568 2012.
- 569 Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Soria Ugalde, J.M., Cuenca, R., Braud, I., Haverkamp, R.: Beerkan  
570 estimation of soil transfer parameters through infiltration experiments—BEST. Soil Sci. Soc. Am. J., 70, 521–  
571 532, <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0026>, 2006.
- 572 Le Boulch, M., Déhais, P., Combes, S., Pascal, G.: The MACADAM database: a MetAboliC pAthways DAtabase  
573 for Microbial taxonomic groups for mining potential metabolic capacities of archaeal and bacterial taxonomic  
574 groups. Database 2019, <https://doi.org/10.1093/database/baz049>, 2019.
- 575 Le Coustumer, S., Barraud, S.: Long-term hydraulic and pollution retention performance of infiltration systems.  
576 Water Sci. Technol., 55, 235–243, <https://doi.org/10.2166/wst.2007.114>, 2007.
- 577 Lladó, S., Baldrian, P.: Community-level physiological profiling analyses show potential to identify the  
578 copiotrophic bacteria present in soil environments. PLoS One, 12: e0171638,  
579 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171638>, 2017.
- 580 Louca, S., Parfrey, L.W., Doebeli, M.: Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome.  
581 Science, 353, 1272–1277, <https://doi.org/10.1126/science.aaf4507>, 2016.
- 582 Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stombaugh, J., Knight, R.: UniFrac: an effective distance metric for  
583 microbial community comparison. ISME J., 5, 169–172, <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>, 2011.
- 584 Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasiewicz, K., Fudala-Ksiazek, S.: Antimicrobial resistance of  
585 *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. Environ. Sci.  
586 Pollut. Res., 22, 19823–19834, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5098-y>, 2015.
- 587 Mansour, I., Heppell, C.M., Ryo, M., Rillig, M.C.: Application of the microbial community coalescence concept  
588 to riverine networks: Riverine microbial community coalescence. Biol. Rev., 93, 1832–1845,  
589 <https://doi.org/10.1111/brv.12422>, 2018.
- 590 Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T.R., Szewzyk, U., Lawrence, J.R.: Phylogenetic composition, spatial  
591 structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal  
592 laser scanning microscopy. Microb. Ecol., 37, 225–237, <https://doi.org/10.1007/s002489900148>, 1999.
- 593 Marsalek, J., Chocat, B.: International report: Stormwater management. Water Sci. Technol. 46, 1–17, 2002.
- 594 Marti, R., Bécouze-Lareure, C., Ribun, S., Marjolet, L., Bernardin Souibgui, C., Aubin, J.-B., Lipeme Kouyi, G.,  
595 Wiest, L., Blaha, D., Courmoyer, B.: Bacteriome genetic structures of urban deposits are indicative of their  
596 origin and impacted by chemical pollutants. Sci. Rep., 7: 13219, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13594-8>,  
597 2017.

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



- 598 McCarthy, D.T., Jovanovic, D., Lintern, A., Teakle, I., Barnes, M., Deletic, A., Coleman, R., Rooney, G., Prosser,  
599 T., Coutts, S.: Source tracking using microbial community fingerprints: method comparison with  
600 hydrodynamic modelling. *Water Res.*, 109, 253–265, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.043>, 2017.
- 601 McGrane, S.J.: Impacts of urbanisation on hydrological and water quality dynamics, and urban water management:  
602 a review. *Hydrol. Sci. J.*, 61, 2295–2311, <https://doi.org/10.1080/02626667.2015.1128084>, 2016.
- 603 Mejía, A.I., Moglen, G.E.: Spatial patterns of urban development from optimization of flood peaks and  
604 imperviousness-based measures. *J. Hydrol. Eng.*, 14, 416–424, [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)1084-0699\(2009\)14:4\(416\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1084-0699(2009)14:4(416)), 2009.
- 606 Mermillod-Blondin, F., Simon, L., Maazouzi, C., Foulquier, A., Delolme, C., Marmonier, P.: Dynamics of  
607 dissolved organic carbon (DOC) through stormwater basins designed for groundwater recharge in urban area:  
608 assessment of retention efficiency. *Water Res.*, 81, 27–37, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.031>, 2015.
- 609 Mermillod-Blondin, F., Voisin, J., Marjolet, L., Marmonier, P., Cournoyer, B.: Clay beads as artificial trapping  
610 matrices for monitoring bacterial distribution among urban stormwater infiltration systems and their connected  
611 aquifers. *Environ. Monit. Assess.*, 191, 58, <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7190-0>, 2019.
- 612 Miyahara, M., Kim, S.-W., Fushinobu, S., Takaki, K., Yamada, T., Watanabe, A., Miyauchi, K., Endo, G., Wakagi,  
613 T., Shoun, H.: Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide  
614 emissions from wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 4619–4625,  
615 <https://doi.org/10.1128/AEM.01983-09>, 2010.
- 616 Murphy, E.M., Ginn, T.R.: Modeling microbial processes in porous media. *Hydrogeol. J.*, 8, 142–158,  
617 <https://doi.org/10.1007/s100409900043>, 2000.
- 618 Noble, R.C., Overman, S.B.: *Pseudomonas stutzeri* infection. A review of hospital isolates and a review of the  
619 literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 19, 51–56, [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(94\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0732-8893(94)90051-5), 1994.
- 620 Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P.,  
621 Stevens, M.H.H., Wagner, H.: vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3–0. 2015, 2015.
- 622 Pigneter, M., Mermillod-Blondin, F., Volatier, L., Romestaing, C., Maire, E., Adrien, J., Guillard, L., Roussel, D.,  
623 Hervant, F.: Urban pollution of sediments: Impact on the physiology and burrowing activity of tubificid worms  
624 and consequences on biogeochemical processes. *Sci. Total Environ.*, 568, 196–207,  
625 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.174>, 2016.
- 626 Pitt, R., Clark, S., Field, R.: Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban*  
627 *Water*, 1, 217–236, [https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(99\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(99)00014-X), 1999.
- 628 Pohlen, E., Marxsen, J., Küsel, K.: Pioneering bacterial and algal communities and potential extracellular enzyme  
629 activities of stream biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 71, 364–373, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00817.x>, 2010.
- 631 Powelson, D.K., Gerba, C.P., Yahya, M.T.: Virus transport and removal in wastewater during aquifer recharge.  
632 *Water Res.*, 27, 583–590, [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90167-G](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90167-G), 1993.

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



- 633 Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P.: FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of  
634 a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.*, 26, 1641–1650, <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>, 2009.
- 635 Redman, J.A., Grant, S.B., Olson, T.M., Estes, M.K.: Pathogen filtration, heterogeneity, and the potable reuse of  
636 wastewater. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1798–1805, <https://doi.org/10.1021/es0010960>, 2001.
- 637 Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., Smyth, G.K.: limma powers differential  
638 expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.*, 43, e47–e47,  
639 <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>, 2015.
- 640 Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley,  
641 B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Horn, D.J.V., Weber, C.F.:  
642 Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and  
643 comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 7537–7541,  
644 <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>, 2009.
- 645 Sébastien, C., Barraud, S., Ribun, S., Zoropogui, A., Blaha, D., Becouze-Lareure, C., Kouyi, G.L., Cournoyer, B.:  
646 Accumulated sediments in a detention basin: chemical and microbial hazard assessment linked to hydrological  
647 processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, 5367–5378, <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2397-z>, 2014.
- 648 Shuster, W.D., Bonta, J., Thurston, H., Warnemuende, E., Smith, D.R.: Impacts of impervious surface on  
649 watershed hydrology: A review. *Urban Water J.*, 2, 263–275, <https://doi.org/10.1080/15730620500386529>,  
650 2005.
- 651 Tao, Y., Zhou, Y., He, X., Hu, X., Li, D.: *Pseudomonas chengduensis* sp. nov., isolated from landfill leachate. *Int.*  
652 *J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 95–100, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.050294-0>, 2014.
- 653 Tedoldi, D., Chebbo, G., Pierlot, D., Kovacs, Y., Gromaire, M.-C.: Impact of runoff infiltration on contaminant  
654 accumulation and transport in the soil/filter media of sustainable urban drainage systems: A literature review.  
655 *Sci. Total Environ.*, 569–570, 904–926, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.215>, 2016.
- 656 Tikhonov, M.: Community-level cohesion without cooperation. *eLife*, 5, <https://doi.org/10.7554/eLife.15747>,  
657 2016.
- 658 Vadstein, O., Attramadal, K.J.K., Bakke, I., Olsen, Y.: K-Selection as Microbial Community Management  
659 Strategy: A Method for Improved Viability of Larvae in Aquaculture. *Front. Microbiol.*, 9:2730,  
660 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02730>, 2018.
- 661 van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.: Influence of interfaces on microbial activity.  
662 *Microbiol. Rev.*, 54, 75–87, 1990.
- 663 Vezzaro, L., Mikkelsen, P.S.: Application of global sensitivity analysis and uncertainty quantification in dynamic  
664 modelling of micropollutants in stormwater runoff. *Environ. Modell. Softw.*, 27, 40–51,  
665 <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2011.09.012>, 2012.
- 666 Voisin, J., Cournoyer, B., Mermillod-Blondin, F.: Assessment of artificial substrates for evaluating groundwater  
667 microbial quality. *Ecol. Indicators*, 71, 577–586, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.035>, 2016.

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
 Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
 © Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



- 668 Voisin, J., Courmoyer, B., Vienney, A., Mermillod-Blondin, F.: Aquifer recharge with stormwater runoff in urban  
 669 areas: Influence of vadose zone thickness on nutrient and bacterial transfers from the surface of infiltration  
 670 basins to groundwater. *Sci. Total Environ.*, 637–638, 1496–1507,  
 671 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.094>, 2018.
- 672 Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R.: Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA  
 673 sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 5261–5267,  
 674 <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>, 2007.
- 675 Winiarski, T., Lassabatere, L., Angulo-Jaramillo, R., Goutaland, D.: Characterization of the heterogeneous flow  
 676 and pollutant transfer in the unsaturated zone in the fluvio-glacial deposit. *Procedia Environ. Sci.*, 19, 955–  
 677 964, <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2013.06.105>, 2013.
- 678



679

**Table 1.** Aquifer 16S rRNA gene (*rrs*) OTUs detected in the upper compartments of the investigated watershed and SIS\*.

	Upstream SIS					
	AQ_bio_up1	AQ_bio_up2	AQ_bio_up3	AQ_wat_up1	AQ_wat_up2	AQ_wat_up3
(A) Number of aquifer <i>rrs</i> OTUs shared with the upper compartments	185/220	110/160	118/173	93/143	80/164	165/464
(B) Relative abundance of the shared <i>rrs</i> OTUs in the aquifer (in %)	99.4	95.0	96.4	43.8	45.4	33.6
(C) Relative abundance of the shared <i>rrs</i> OTUs in the upper compartments (in %)	24.9	15.5	15.8	9.7	9.8	11.3
	downstream SIS					
	AQ_bio_dw1	AQ_bio_dw2	AQ_bio_dw3	AQ_wat_dw1	AQ_wat_dw2	AQ_wat_dw3
(A) Number of aquifer <i>rrs</i> OTUs shared with the upper compartments	340/403	308/353	321/362	203/523	357/594	468/1052
(B) Relative abundance of the shared <i>rrs</i> OTUs in the aquifer (in %)	99.4	99.4	99.6	52.2	83.4	53.7
(C) Relative abundance of the shared <i>rrs</i> OTUs in the upper compartments (in %)	29.7	30.7	39.4	12.5	32.0	24.2

\*in (A), the number of aquifer *rrs* OTUs found in the upper compartments (WS, DB, IB) was computed per aquifer sample recovered upstream (up) or downstream (dw) the SIS (see Fig. 1 for the sampling design), after a re-sampling of the reads set at 20,624 per sample; in (B), the relative abundance of these shared OTUs per aquifer sample is indicated; in (C), the relative abundance of these shared aquifer OTUs among the upper compartments is indicated. AQ\_wat: Aquifer waters; AQ\_bio: Aquifer clay beads biofilms; up: upstream the SIS; dw: downstream the SIS.



680

**Table 2.** Coalescence of surface and aquifer bacterial communities inferred by the SourceTracker Bayesian approach and the 16S rRNA gene meta-barcoding dataset\*

samples	WS			DB			IB			AQ_wat_up			unknown		
	mean	rsd	mean	rsd	mean	rsd	mean	rsd	mean	rsd	mean	rsd	mean	rsd	mean
AQ_wat_dw1	22.82%	9.67	0.02%	94.37	3.83%	10.71	0.02%	96.25	73.31%	2.49					
1 - waters															
AQ_wat_dw2	58.94%	6.03	6.26%	10.74	1.27%	20.32	12.64%	21.27	20.89%	20.27					
AQ_wat_dw3	25.49%	7.06	9.07%	10.47	0.81%	24.58	3.83%	31.01	60.81%	2.06					
AQ_bto_dw1	24.04%	13.55	19.95%	8.47	0.17%	107.45	46.37%	4.71	9.14%	4.72					
1 - biofilms															
AQ_bto_dw2	29.44%	18.54	17.28%	9.91	0.16%	94.43	44.71%	7.05	8.40%	6.77					
AQ_bto_dw3	44.66%	8.39	22.22%	15.6	0.37%	105.66	25.90%	4.21	6.84%	13.55					
AQ_bto_up1	51.18%	0.98													
2 - biofilms															
AQ_bto_up2	81.11%	0.23													
AQ_bto_up3	60.31%	0.74													

\* Two analyses are shown: (1) reads from WS, DB, IB, and aquifer waters from upstream the SIS were considered as the sources of taxa for the aquifer samples downstream the SIS; (2) reads from WS and the aquifer waters upstream the SIS were considered as the sources of taxa for the aquifer biofilms recovered upstream the SIS. SourceTracker was run 3 times using the 16S rRNA gene OTU contingency table and the default parameters. Relative contributions of the sources were averaged. Relative standard deviations (%RSD) are indicated, and used as confidence values. RSD > 100% indicates low confidence on the estimated value. WS: Watershed runoff waters; DB: Detention basin sediments; IB: Infiltration basin sediments. Sequences that could not be attributed to one of the tested sources were grouped under the term unknown.

22





681

**Table 3.** Relative distribution of *tpm* reads per OTU (mean  $\pm$  sd) shared between the upper compartments and the aquifer, and that were allocated to well-defined species.<sup>1</sup>

Genus	Species	OTU code <sup>2</sup>	WS	DB	IB	AQ_Wat_up	AQ_Bio_up	AQ_Wat_dw	AQ_Bio_dw
<i>Nitrosomonas</i>	<i>oligotrophia</i>	Otu00035	nd	1.5 $\pm$ 3.40	0.15 $\pm$ 0.30	nd	+	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	Otu00066	0.42 $\pm$ 1.13	nd	+	nd	nd	nd	0.17 $\pm$ 0.30
<i>Pseudomonas</i>	<i>chengduensis</i>	Otu00024	nd	+	+	20.43 $\pm$ 35.39	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>extremaustralis</i>	Otu04178	nd	+	nd	nd	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>fregi</i>	Otu00197	0.61 $\pm$ 4.05	+	nd	nd	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>pseudocaligenes</i>	Otu00197	0.07 $\pm$ 0.38	+	nd	+	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	Otu00800	+	+	nd	nd	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>stutzeri</i>	Otu00119 & Otu10066	0.06 $\pm$ 0.33	nd	+	3.06 $\pm$ 5.29	nd	nd	+
<i>Pseudomonas</i>	<i>umsongensis</i>	Otu00005	+	+	nd	0.41 $\pm$ 0.71	17.79 $\pm$ 20.11	5.34 $\pm$ 8.58	11.71 $\pm$ 13.17
<i>Pseudomonas</i>	<i>viridiflava</i>	Otu00204	0.06 $\pm$ 0.31	nd	0.3 $\pm$ 1.09	nd	nd	0.07 $\pm$ 0.12	nd
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>acidaminiphila</i>	Otu00072 & Otu01119	0.09 $\pm$ 0.42	0.29 $\pm$ 0.91	0.06 $\pm$ 0.22	nd	nd	+	nd
<i>Xanthobacter</i>	<i>autotrophicus</i>	Otu00501	+	+	nd	nd	nd	0.06 $\pm$ 0.11	+
<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis/campetris</i>	Otu00019 & Otu00878	0.25 $\pm$ 0.75	nd	1.24 $\pm$ 2.07	16.04 $\pm$ 27.78	nd	nd	+
<i>Xanthomonas</i>	<i>cannabis</i>	Otu00004	3.74 $\pm$ 9.47	nd	nd	nd	+	+	+

<sup>1</sup> All reads from *tpm* OTUs shared between the upper compartments and the aquifer were used to compute the relative abundances.

<sup>2</sup> *tpm* sequences of the OTUs are shown in Table S8. WS: Watershed runoff waters; DB: Detention basin deposits; IB: soil of the infiltration basin; AQ\_water: Aquifer waters; AQ\_bio: Aquifer biofilms. + : OTUs with a relative abundance  $< 0.05\%$ ; nd : not detected.

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



682 **Figure captions**

683 **Figure 1.** Scheme illustrating the stormwater runoff path from the industrial watershed (WS) towards the  
684 stormwater infiltration system (SIS) used in this study. The urban watershed is located in Chassieu (France). The  
685 SIS is made of a detention basin (DB) and an infiltration basin (IB), and is connected to the Lyon 200 km<sup>2</sup> east  
686 aquifer (AQ). (© Google)

687 **Figure 2.** General features of the V5-V6 16S rRNA gene meta-barcoding DNA sequences obtained from runoffs,  
688 SIS, and aquifer samples. See Fig. 1 for a description of the experimental design. The main bacterial phyla (A),  
689 and alpha diversity indices (B), are shown per sampled compartment. Bacterial diversity was estimated using the  
690 Shannon index. One-way ANOVA with multiple Tukey post hoc tests were performed to investigate the  
691 differences between compartments. Different letter codes indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). WS, runoff  
692 waters from the watershed; DB: sediments from the detention basin; IB: soils from the infiltration basin;  
693 AQ\_water: Aquifer waters; AQ\_bio: Aquifer clay beads biofilms.

694 **Figure 3.** PCoA analysis of weighted UniFrac dissimilarities between the V5-V6 16S rRNA gene OTU profiles  
695 of the watershed runoff waters (WS), urban sediments and soils from the connected detention (DB) and infiltration  
696 (IB) basins receiving the runoffs, and waters (AQ\_water) and biofilms (AQ\_bio) from the connected aquifer. See  
697 Fig. 1 for a description of the experimental site. Ellipses are representative of the variance observed (standard  
698 error) between the ordinations of a group of samples. PERMANOVA tests confirmed the significance ( $p < 0.001$ )  
699 of the groupings.

700 **Figure 4.** Relative numbers of potentially pathogenic bacterial genera along the watershed down the aquifer. The  
701 abundance (rel. abund.) of bacterial genera exclusively detected in upper compartments (A) or both in upper  
702 compartments and aquifer (B) are presented. Size of bubbles is proportional to the relative abundance (in %) of  
703 each bacterial genus per sampled compartment. WS, runoff waters from the watershed; DB: sediments from the  
704 detention basin; IB: sediments from the infiltration basin; AQ\_water: Aquifer waters; AQ\_bio: Aquifer clay beads  
705 biofilms.

706

707

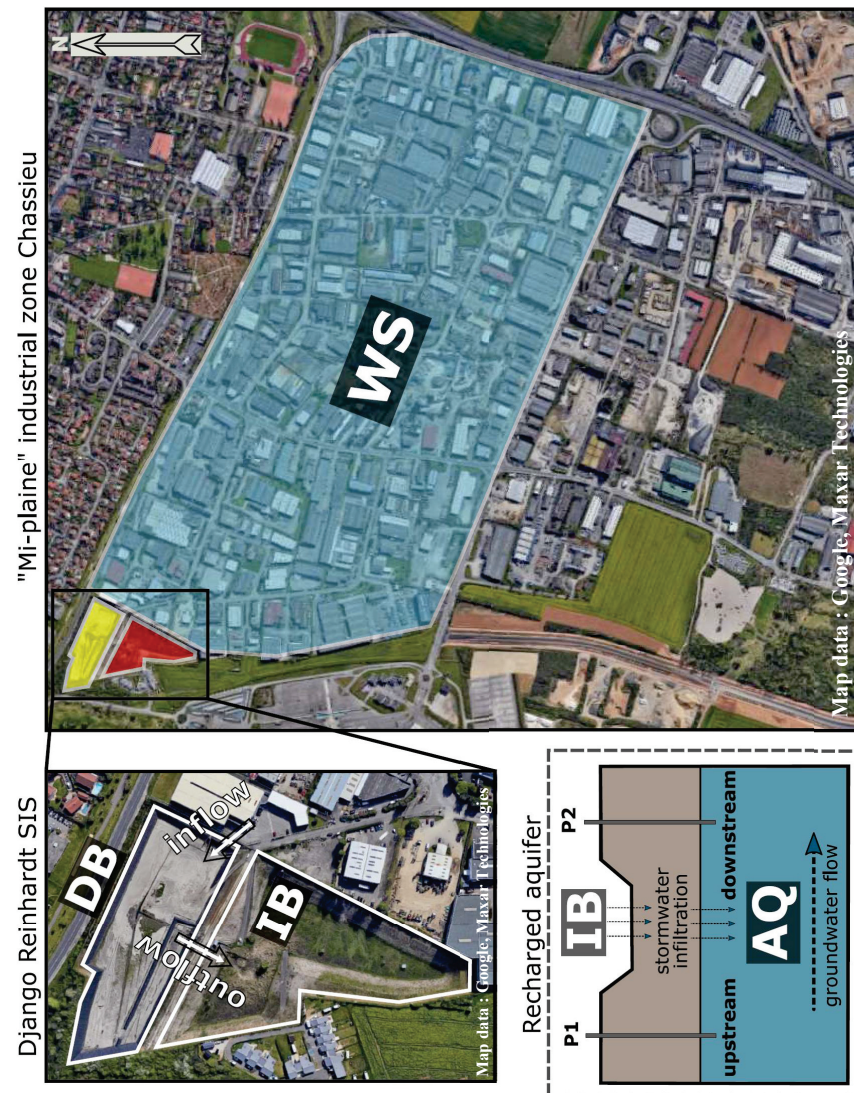
<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



Hydrology and  
Earth System  
Sciences  
Discussions



708 Fig. 1 - Colin et al. hess-2020-39



709

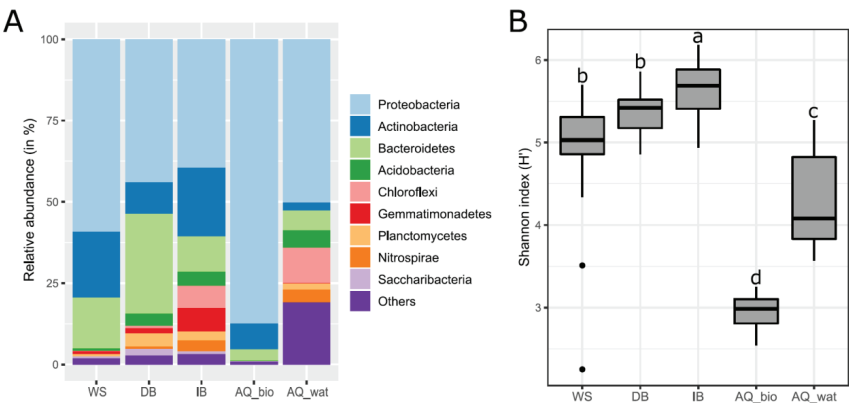
710

711

712

<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.

713 Fig. 2 - Colin et al. hess-2020-39  
714

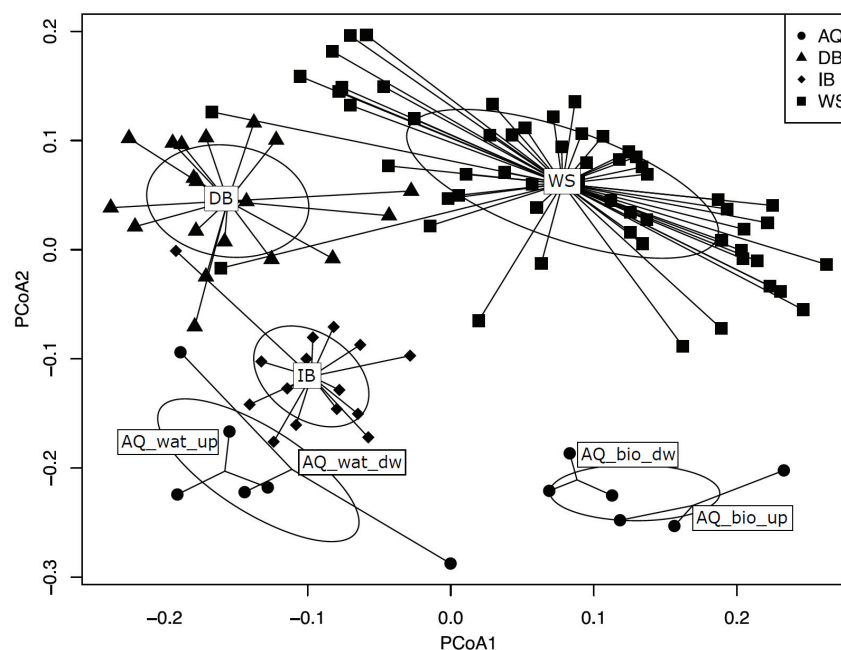


715  
716  
717

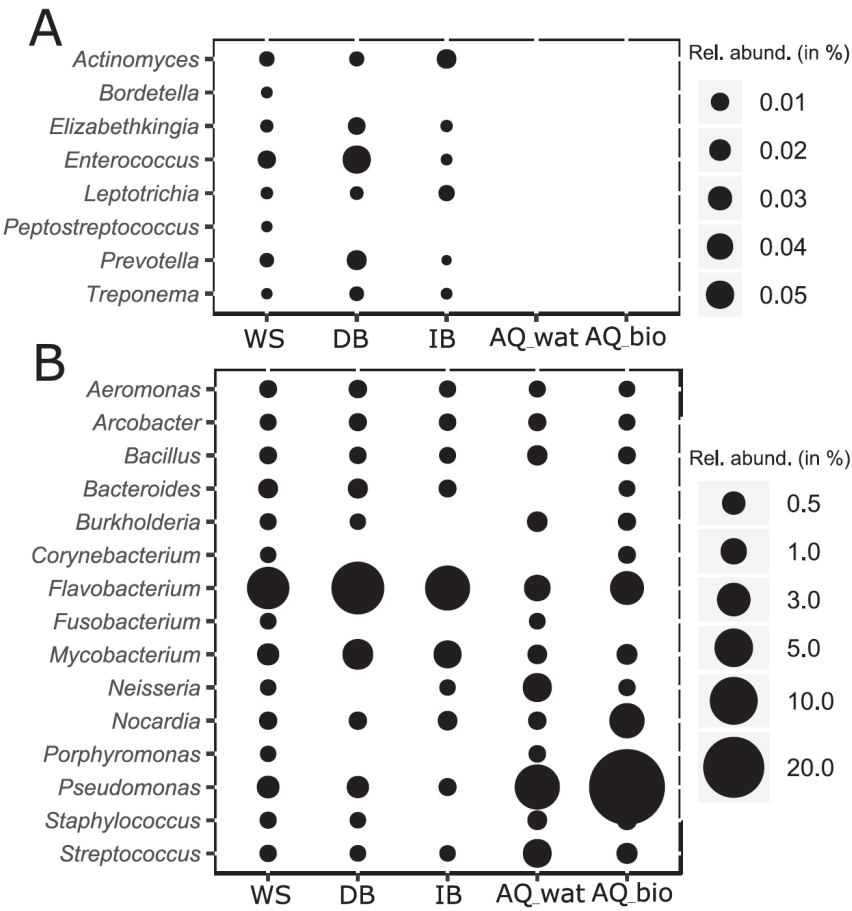
<https://doi.org/10.5194/hess-2020-39>  
Preprint. Discussion started: 17 February 2020  
© Author(s) 2020. CC BY 4.0 License.



Fig. 3 - Colin et al. hess-2020-39



734 Fig. 4 - Colin et al. hess-2020-39  
735



**Table 1. Aquifer 16S rRNA gene (*rrs*) OTUs detected in the upper compartments of the investigated watershed and SIS\***

	Upstream SIS					
	AQ_bio_up1	AQ_bio_up2	AQ_bio_up3	AQ_wat_up1	AQ_wat_up2	AQ_wat_up3
(A) Number of aquifer <i>rrs</i> OTUs shared with the upper compartments	185/220	110/160	118/173	93/143	80/164	165/464
(B) Relative abundance of the shared <i>rrs</i> OTUs in the aquifer (in %)	99.4	95.0	96.4	43.8	45.4	33.6
(C) Relative abundance of the shared <i>rrs</i> OTUs in the upper compartments (in %)	24.9	15.5	15.8	9.7	9.8	11.3
	downstream SIS					
	AQ_bio_dw1	AQ_bio_dw2	AQ_bio_dw3	AQ_wat_dw1	AQ_wat_dw2	AQ_wat_dw3
(A) Number of aquifer <i>rrs</i> OTUs shared with the upper compartments	340/403	308/353	321/362	203/523	357/594	468/1052
(B) Relative abundance of the shared <i>rrs</i> OTUs in the aquifer (in %)	99.4	99.4	99.6	52.2	83.4	53.7
(C) Relative abundance of the shared <i>rrs</i> OTUs in the upper compartments (in %)	29.7	30.7	39.4	12.5	32.0	24.2

\*(A) The number of aquifer *rrs* OTUs found in the upper compartments (WS, DB, IB) was computed per aquifer sample recovered upstream (up) or downstream (dw) the SIS (see Fig. 1), after a re-sampling of the reads set at 20,624 per sample. (B) The relative abundance of these shared OTUs per aquifer sample is indicated. (C) The relative abundance of these shared aquifer OTUs among the upper compartments is indicated. AQ\_wat: Aquifer waters; AQ\_bio: Aquifer clay beads biofilms; up: upstream the SIS, dw: downstream the SIS.

**Table 2. Probable sources of aquifer bacteria inferred by the SourceTracker Bayesian approach\***

location	sample type	samples (sink)	contributing sources (%)							
			WS		DB		IB		Others	
			mean	(%RSD)	mean	(%RSD)	mean	(%RSD)	mean	(%RSD)
Upstream	waters	AQ_wat_up1	1.00%	(0%)	0.67	(86.6%)	0	-	98.00%	(1.02%)
		AQ_wat_up2	NS		NS		3	(33.33%)	96.33%	(0.6%)
		AQ_wat_up3	1.00%	(0%)	1.00%	(0%)	0	-	97.67%	(0.59%)
	biofilms	AQ_bio_up1	63.33	(29.21%)	41.33%	(84.96%)	1	0	7.00%	(86.9%)
		AQ_bio_up2	78.33%	(6.43%)	5.33%	(60.27%)	3.67	(78.73%)	12.67%	(24.12%)
		AQ_bio_up3	61.67	(11.5%)	16.33%	(76.06%)	1	0	21.33%	(39.87%)
			NS		NS		12.67%	(12.06%)	87.00%	(1.99%)
Downstream	waters	AQ_wat_dw1	8.67%	(29.04%)	9.67%	(21.53%)	4.33%	(13.32%)	77.33%	(1.49%)
		AQ_wat_dw2	46.67%	(31%)	20.00%	(82.61%)	2.33%	(49.49%)	31.00%	(8.53%)
		AQ_wat_dw3	58.67%	(26.09%)	31.67%	(42.41%)	1.00%	(0%)	9.00%	(19.25%)
	biofilms	AQ_bio_dw1	60.00%	(23.51%)	30.00%	(45.83%)	1.00%	(0%)	9.67%	(5.97%)
		AQ_bio_dw2	51.67%	(34.1%)	41.33%	(39.78%)	1.00%	(0%)	6.33%	(32.87%)
		AQ_bio_dw3								

\*SourceTracker was run 3 times using the *rrs* (16S rRNA gene) OTU contingency table and the default parameters. Relative contributions of the sources were averaged. Relative standard deviations (%RSD) are indicated, and used as confidence values. RSD > 100% indicates low confidence on the estimated value. WS: Watershed runoff waters; DB: Detention basin sediments; IB: Infiltration basin sediments. Sequences that could not be attributed to one of the tested sources (DB, IB, WS) were identified as “Others”.



Table 3. Relative distribution of *tpm* reads per OTU (mean  $\pm$  sd) shared between the upper compartments and the aquifer, and that were allocated to well-defined species<sup>1</sup>

Genus	Species	OTU code <sup>2</sup>	WS	DB	IB	AQ wat	AQ bio
<i>Nitrosomonas</i>	<i>oligotropha</i>	Otu00035	nd	1.5 $\pm$ 3.40	0.15 $\pm$ 0.30	+	+
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	Otu00066	0.42 $\pm$ 1.13	nd	+	nd	0.09 $\pm$ 0.21
<i>Pseudomonas</i>	<i>chengduensis</i>	Otu00024	nd	+	+	10.22 $\pm$ 25.02	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>extremaustralis</i>	Otu04178	nd	+	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>fragi</i>	Otu00197	0.61 $\pm$ 4.05	nd	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>pseudocaligenes</i>	Otu00197	0.07 $\pm$ 0.38	+	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	Otu00800	+	+	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>stutzeri</i>	Otu00119 & Otu10066	0.06 $\pm$ 0.33	nd	+	1.53 $\pm$ 3.74	+
<i>Pseudomonas</i>	<i>umsongensis</i>	Otu00005	+	+	nd	2.87 $\pm$ 6.07	14.75 $\pm$ 15.56
<i>Pseudomonas</i>	<i>viridiflava</i>	Otu00204	0.06 $\pm$ 0.31	nd	0.3 $\pm$ 1.09	+	nd
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>acidaminiphila</i>	Otu00072 & Otu01119	0.09 $\pm$ 0.42	0.29 $\pm$ 0.91	0.06 $\pm$ 0.22	+	nd
<i>Xanthobacter</i>	<i>autotrophicus</i>	Otu00501	+	+	nd	+	+
<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis/campestris</i>	Otu00019 & Otu00878	0.25 $\pm$ 0.75	nd	1.24 $\pm$ 2.07	8.02 $\pm$ 19.65	+
<i>Xanthomonas</i>	<i>cannabis</i>	Otu00004	3.74 $\pm$ 9.47	nd	nd	+	+

<sup>1</sup> Only reads from *tpm* OTUs shared between the upper compartments and the aquifer were used to compute the relative abundances.

<sup>2</sup> *tpm* sequences of the OTUs are shown in Table S7. WS: Watershed runoff waters; DB: Detention basin deposits; IB: soil of the infiltration basin; AQ water: Aquifer waters; AQ bio: Aquifer biofilms. + : OTUs with a relative abundance  $< 0.1\%$ . nd : not detected.





## **RAPPORT D'ACTIVITE SCIENTIFIQUE OTHU 2013-2016**

Décembre 2016



**LA REDACTION DU DOCUMENT A ETE COORDONNEE PAR :**

--GISLAIN LIPEME KOUYI

--LAETITIA BACOT

**AVEC LES CONTRIBUTIONS REDACTIONNELLES DE (PAR ORDRE ALPHABETIQUE) :**

BACOT LAETITIA

BARRAUD SYLVIE

BEDELL JEAN-PHILIPPE

BERTRAND-KRAJEWSKI JEAN-LUC

BLAHA DIDIER

BRANGER FLORA

BRAUD ISABELLE

BREIL PASCAL

CASTEBRUNET HELENE

CHERQUI FREDERIC

COURNOYER BENOIT

DURRIEU CLAUDE

LASSABATERE LAURENT

LIPEME KOUYI GISLAIN

MANDON CLAIRE

MARMONIER PIERRE

MARTI ROMAIN

MERMILLOD-BLONDIN FLORIAN

MIGNOT EMMANUEL

NAMOUR PHILIPPE

NAVRATIL OLDRICH

PAQUIER ANDRE

PERRODIN YVES

RIVIERE NICOLAS

RENARD FLORENT

RODRIGUEZ-NAVA VERONICA

TOUSSAINT JEAN-YVES

VAREILLES SOPHIE

VAUTRIN FLORIAN

WALCKER NICOLAS

WIEST LAURE

WINIARSKI THIERRY

### C.3.1.3 Caractérisation microbiologique et relations avec les caractéristiques physico-chimiques

#### a) Equipes et Disciplines mobilisées

Microbiologie environnementale et clinique : Equipe BPOE, UMR CNRS 5557, UMR INRA 1418 Ecologie Microbienne (LEM), Université Lyon 1 & VetAgro Sup  
Hydrologie urbaine et génie civil : DEEP INSA Lyon  
Stratification sédimentaire : ENTPE – LEHNA  
Chimie analytique : ISA

#### b) Objectifs

- Préciser le « core » bactériome associé aux sédiments urbains (dépôt de bassins de retenue et d'infiltration / zone industrielle)
- Identifier les espèces bactériennes dominantes et déduire les éléments clés de leur développement par analyse des corrélations avec les jeux de données de chimie environnementale
- Evaluer les dangers de flambée environnementale de formes bactériennes pathogènes dans les sédiments de Bassin de retenue (BR) et sols de bassins d'infiltration (BI)
- Définir le rôle relatif des sédiments urbains dans le cycle épidémiologique de certaines formes bactériennes pathogènes

#### c) Méthodes

##### Sites/dispositifs : sédiment du BR et sols du BI du site Django-Reinhardt de Chassieu

Les eaux ayant circulé sur des surfaces anthropisées sont chargées en polluants chimiques et en micro-organismes pouvant atteindre des concentrations très significatives. La composante microbienne des eaux de ruissellement a fait l'objet de peu d'études, et les dangers microbiologiques associés n'ont pas été définis. Les conséquences de l'imperméabilisation ont conduit au développement des réseaux d'eau pluviale, permettant, classiquement, une meilleure gestion des eaux de ruissellement par un déversement dans un cours d'eau récepteur ou vers des bassins de retenue-décantation favorisant leur stockage et parfois leur infiltration. Ces bassins développent de véritables écosystèmes mais requièrent une caractérisation de leurs dépôts dans l'objectif de définir les risques associés et traitements appropriés pour leur dépollution.

Dans ce contexte, nous avons défini des actions de recherche permettant de préciser l'écologie microbienne des sédiments d'un BR/BI, et d'identifier des composantes bactériennes pouvant représenter un danger pour l'homme (Figure 18 & Figure 17). Le BR/BI Django-Reinhardt (R) situé à Chassieu (Est lyonnais) a été utilisé pour ces actions de recherche. Ces actions ont été développées dans l'objectif de tester des hypothèses concernant le dépérissement/l'enrichissement de bactéries observées sur le bassin-versant de Chassieu (Partie C2.2.1) dont l'espèce pathogène *Pseudomonas aeruginosa* et certaines bactéries d'origine fécale. Des travaux de l'équipe ont montré un dépérissement rapide de certains clones de *P. aeruginosa* dans les sols agricoles mais les alimentations soutenues en eau de ruissellement des BR pourraient représenter un facteur favorable au développement de cette espèce. Ces premières études ont permis de tester l'hypothèse d'une implantation pérenne de certains taxons dans un BR/BI et d'une occurrence de flambées (enrichissement) ponctuelles liées aux activités sur le bassin-versant urbain (mi-plaine) alimentant le BR. Pour permettre l'identification de ces taxons bactériens, une approche sans *a priori* basée sur des analyses métagénomiques a été développée, et a été complétée d'études sur les formes cultivables des espèces observées.

## 2. Les « core » microbiotes des bassins de retenue et d'infiltration

Les bilans méta-taxogénomiques ont été effectués avec le marqueur *rrs* (16S rDNA) mais ont nécessité le développement d'un nouveau marqueur, *tpm*, pour les inférences aux niveaux « espèces » et infra-espèces de taxons d'intérêt sanitaire. Ces marqueurs permettent la définition d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU) sur la base de l'analyse de séquences produites à partir d'amplicons PCR amplifiés d'ADN extraits des sédiments ou sols du site d'étude. Des ADN extraits de sédiments ont été analysés depuis 2010 pour le BR (Figure 17) et depuis 2015 pour le BI (Figure 18). Depuis 2016, ces travaux ont été complétés par une analyse des ADN extraits de particules aérosolisées. Voir également la partie C3.5 pour les analyses sur les eaux de la nappe en amont et aval du BI, et la partie C2.2.1 pour les analyses d'eau de ruissellement sur le BV industriel de la commune de Chassieu qui alimente le BR Django-Reinhardt.

L'analyse des OTU permet une estimation de la richesse des peuplements bactériens, et de définir et suivre l'évolution de leur structure. Cette étude a permis de définir une liste de taxons bactériens dominants mais également de groupes pouvant représenter une préoccupation sanitaire. Les espèces bactériennes pathogènes ou indicatrices d'une contamination fécale ont fait l'objet d'analyses microbiologiques via des dénombrements de formes cultivables.

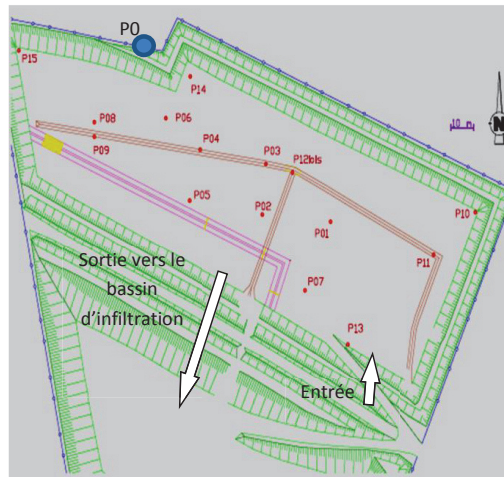


Figure 17 Zones de prélèvement des dépôts du bassin de retenue. Une zone de 40 cm<sup>2</sup> a été prélevée jusqu'au niveau de la dalle de béton ; les anthroposols des points P0, P1, P2, P4, P7, et P12 (fosse de décantation) ont été analysés par méta-taxogénomique « *rrs* » et « *tpm* ». Des pièges à particules ont été installés sur ces différents points pour obtenir des dépôts récents obtenus après une forte pluie. Nombre de métagénomomes = 50 points x méta-*rrs* + 50 méta-*tpm* + aérosols = >100 méta-analyses « taxonomiques »

Pour les actions de recherche sur le bassin d'infiltration, trois grandes zones d'échantillonnage ont été définies. Ces zones sont représentatives de l'hétérogénéité des compositions et textures des sédiments (Figure 18). En effet, les différences de hauteur du sol ainsi que l'éloignement de l'entrée du bassin d'infiltration entraînent un remplissage inégal du bassin. Lors de faibles événements pluvieux, certaines zones du bassin (celles éloignées de la zone d'entrée) sont rarement inondées. Ceci se traduit directement par une végétation bien caractéristique de chaque zone, mais se répercute surtout sur la hauteur, la texture et l'humidité des sédiments. La zone d'entrée possède des sédiments colmatés sur une vingtaine de



centimètres. La zone haute présente des sédiments très aérés et riches en débris végétaux sur 2 à 3 cm de hauteur. La zone basse présente des caractéristiques intermédiaires aux deux zones. Les sédiments du BI ont été prélevés sur trois périodes (Novembre 2015 et Avril-Juillet 2016) afin d'étudier l'influence de la température, de la pluviométrie, et autres paramètres et mesures dont les concentrations de certains polluants chimiques.

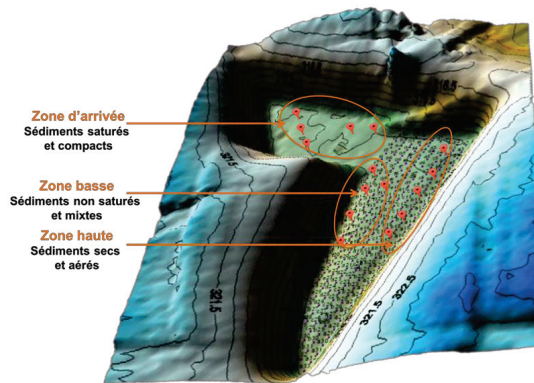


Figure 18: ZONES et points de prélèvements des sédiments du bassin d'infiltration de Django-Reinhardt.

### 3. Dynamiques spatio-temporelles des espèces bactériennes d'intérêt sanitaire.

Les espèces ou groupes d'espèces suivants ont fait l'objet d'un suivi par approches cultivables : *P. aeruginosa*, *Aeromonas caviae*, *E. coli*, entérocoques intestinaux, et les *Nocardia*. Des suivis ont également été faits par approches PCRq (quantitatives) ciblant l'ADN des *Nocardia cyriacigeorgica*, *Bacteroidales* totales, *Bacteroidales* de l'homme (marqueur HF183), et des gènes codant des intégrases appartenant aux intégrons de type 1, 2 et 3 (voir également Partie C2.1.2). Les intégrons sont des supports génétiques susceptibles de véhiculer des gènes impliqués dans certaines antibio-résistances mais également dans le métabolisme de biocides et polluants chimiques variés dont les éléments traces métalliques. Des typages moléculaires infra-spécifiques d'isolats bactériens ont été effectués pour étudier leur proximité avec des isolats cliniques.

#### d) Résultats clés : Scientifiques et opérationnels

##### Bactériome du BR

L'analyse du bactériome du BR a été effectuée sur des échantillons prélevés en 2010, 2012, 2013 et 3 fois en 2014 permettant d'étudier son évolution et les biais d'organisation en fonction du temps, de la position des sédiments au sein du BR (dont la fosse de décantation) et de leur composition chimique, et des descripteurs globaux de fonctionnement du BR et des conditions climatiques. Du point de vue de sa structure, le bactériome montre une organisation qui dépend de la période d'échantillonnage ainsi que de la position. L'évènement de curage du bassin qui a eu lieu début 2013 a marqué une ligne de fracture dans les organisations (Figure 19).

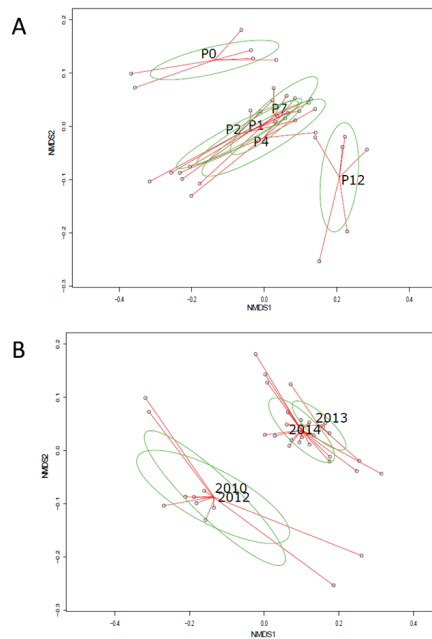


Figure 19 : Ordination NMDS des dissimilarités Bray-Curtis déduites du tableau de contingence des OTU par point d'échantillonnage (P0, P1, P2, P4, P7 and P12) et en fonction du temps. Valeur du stress test = 0.08. Les traits rouges relient les points en fonction (a) du site, et (b) de l'année. L'ellipse verte illustre la variance et une AMOVA a confirmé la significativité du regroupement ( $p < 0.01$ ) s'il n'y avait pas de superposition.

Par ailleurs, parallèlement à cette ligne de séparation temporelle, la localisation des sites de prélèvement au sein du BR a permis de mettre en évidence 3 types d'organisation : (1) une organisation regroupant les échantillons provenant des sédiments de la fosse de décantation, (2) une organisation regroupant les points de prélèvement de surface, et (3) celle du point extérieur au BR. Une organisation dépendante du temps a été confirmée par l'analyse comparative des « cores » (taxa communs) bactériomes 2010/2012 et 2013/2014.

Bien que les phyla les plus présents soient retrouvés

dans les deux types d'organisation, leur occurrence n'est pas la même, de même, les phyla minoritaires semblent spécifiques d'une période (Figure 20). Ce jeu de données a également été utilisé pour identifier les genres susceptibles de contenir des espèces pathogènes. Ceci a permis d'observer un nombre significatif de reads pour les Mycobactéries (2189 reads) > *Pseudomonas* (810 reads) > *Acinetobacter* (711) > *Aeromonas* (133) > *Nocardia* (122) > *Enterococcus* (103) > *Escherichia* (9) > *Staphylococcus* (5) > *Streptococcus* (4). Les *Pseudomonas* et *Aeromonas* peuvent contenir des espèces pathogènes comme *P. aeruginosa*, *A. caviae* et *A. hydrophila*. Ces espèces sont associées à des infections d'origine hydrique. Elles pourraient donc être enrichies par les dispositifs de rétention. Les actinobactéries représentent également une préoccupation sanitaire en fonction des espèces présentes. L'observation de concentrations significatives en *Nocardia* nous a conduit à réaliser une analyse de leur diversité pour préciser les dangers associés. Cette analyse est présentée dans la section suivante.

Pour permettre de préciser la diversité des *Pseudomonas* et *Aeromonas* retrouvées dans le BR/BI de Django-R, des analyses méta-taxogénomiques du marqueur *tpm* ont été effectuées. Ces analyses ont permis d'observer la présence de reads *tpm* de *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. composti*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. brassicaearum*, et *P. toyotomiensis*, dans les ADN extraits des sédiments. Les reads en *P. aeruginosa* étaient peu nombreux et suggèrent un dépérissement de l'espèce au sein du BR. Des quantités élevées de reads *tpm* de *P. aeruginosa* avaient été obtenues des eaux de ruissellement du BV industriel de Chassieu (partie C2.2.1). La Figure 21 présente la diversité observée pour les espèces du genre *Aeromonas* en fonction des points de prélèvement des années 2013 et 2014. *A. caviae* et *A. hydrophila* semblent plus susceptibles de se maintenir dans le BR que *P. aeruginosa*. *A. caviae* et *P. aeruginosa* ont été choisies pour préciser l'incidence du BR sur les dynamiques d'enrichissement et dépérissement de leurs formes cultivables.





*Nocardia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas caviae*) ont été confrontées aux paramètres physiques, chimiques ainsi qu'aux contextes climatiques et hydrologiques des campagnes. Des analyses statistiques (analyse de corrélation et ACP) du jeu de données ont permis de mettre en évidence des relations entre ces composantes. Pour évaluer la capacité du bassin à piéger les bactéries, les eaux d'entrée et de sortie ont été analysées lors de périodes de temps de pluie et périodes sèches.

Les sédiments du BR ont montré des concentrations significatives en formes cultivables pour l'ensemble des indicateurs bactériens choisis dans la section précédente. Des variations temporelles et spatiales très importantes ont été observées (Figure 22). Les analyses en composantes principales (ACP) ont montré que les dénombrements bactériens étaient positivement corrélés avec le pourcentage d'humidité des sédiments (lors du prélèvement) sauf pour *P. aeruginosa* et *A. caviae*.

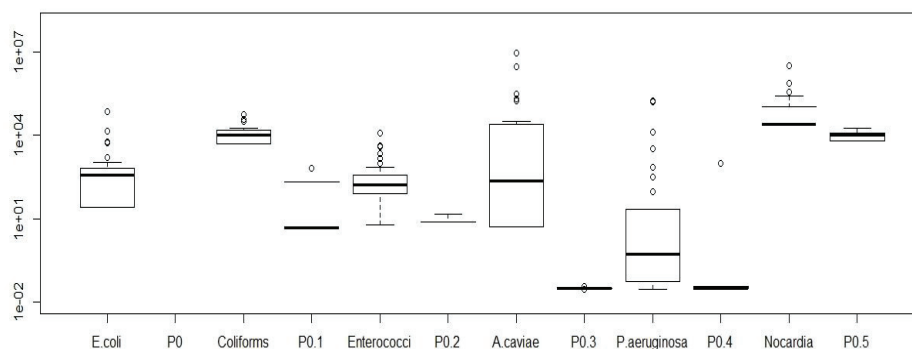


Figure 22 Boxplot des dénombrements bactériens (UFC par g. de matière sèche) pour les 5 points de prélèvements du BR Django-R, les six campagnes, et le témoin P0 (contrôle). Voir Fig. 1 pour les positions dans le BR.

Les sédiments du BR ont, en effet, montré de faibles quantités de *P. aeruginosa*. Ceci est en accord avec la méta-taxogénomique *tpm*. Cependant, la somme des HAP mesurés est ressortie positivement corrélée aux [*Pseudomonas aeruginosa*], en particulier sur les cinq premières campagnes, et pour le point P12. Par contre, cette somme était inversement corrélée aux indicateurs fécaux. Les HAP pourraient être toxiques pour ces indicateurs et favoriser leur dépérissement. Les dénombrements des formes cultivables d'*A. caviae* étaient significativement plus faibles dans le point P0 que les points du bassin. *A. caviae* a été confirmée comme un bon indicateur de la performance d'épuration des formes bactériennes à risque pour la santé humaine. Cependant, les dénombrements bactériens pour les eaux d'entrée et de sortie indiquent des abattements très variables en fonction des périodes et indicateurs utilisés. Il est à noter que la température de l'air était corrélée positivement avec les [*P. aeruginosa* et *A. caviae*]. Ceci est en accord avec les températures de croissance optimale pour ces bactéries (Martin-Carnahan *et al.*, 2005).<sup>29</sup>

Le bassin de rétention a présenté des concentrations significatives en bactéries fécales (*E. coli*, entérocoques intestinaux et coliformes thermotolérants). Ceci est en accord avec la partie C2.2.1. Les concentrations de ces bactéries étaient élevées,  $10^3$  à  $10^4$  UFC /g de matière sèche pour les coliformes et  $10^2$  à  $10^4$  UFC /g de matière sèche pour les entérocoques. Pour comparaison, les matières fécales ont des concentrations de  $10^7$ -

<sup>29</sup> Martin-Carnahan A., Joseph S.W. (2005) *Aeromonadales* ord. nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* [http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-28022-7\\_12](http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-28022-7_12)

$10^9$  UFC /g de matière sèche pour les coliformes, et  $10^5$ - $10^9$  UFC/ g de matière sèche pour les entérocoques (Flahaut *et al.*, 1997<sup>30</sup>). Les coliformes sont à la concentration de  $10^4$ - $10^6$  UFC/g de matière sèche dans les boues d'épuration (Edmonds, 1976<sup>31</sup>). Des relations positives et significatives ont été observées entre les [entérocoques et *E. coli*] et les niveaux de précipitation (hauteur et intensité maximale au pas de temps de 5 min (Imax5)). Le lessivage des voies, avec remise en suspension des particules et érosion, aurait contribué à ces augmentations.

Les sédiments étaient fortement colonisés par les *Nocardia* spp. Ces bactéries apparaissent très répandues dans l'environnement urbain avec des apports réguliers du BV industriel. Une corrélation positive a été mise en évidence entre la taille des particules et [*Nocardia*] suggérant une répartition préférentielle sur des particules fines et légères, donc plutôt mobilisables. Une forte corrélation négative entre les quantités totales d'HAP et *Nocardia* a été trouvée au point P04. Cette corrélation négative a été obtenue pour les HAP pris séparément, mais de façon très variable, suggérant l'absence d'un lien causal. Une corrélation positive avait été trouvée par Le Thi Nhi-Cong *et al.*, (2010)<sup>32</sup> entre les [*Nocardia cyriacigeorgica*] et les hydrocarbures (aliphatiques et aromatiques) de sols contaminés.

La relation entre les valeurs de *Nocardia* totales et les dangers microbiologiques n'est pas démontrée et requière une analyse des espèces et sous-espèces. Pour permettre ces études, un marqueur métatagénomique pour les actinobactéries a été développé sur la base de l'analyse du gène *hsp65*. Des purifications des formes cultivables ont également été effectuées. Ces isolats ont été classés par approches classiques (séquençage du 16S ADN et analyses des propriétés). Ces travaux ont permis d'observer des nombres significatifs d'isolats des espèces *N. farcinica* et *N. cyriacigeorgica*. Ces résultats présentent les premiers éléments de compréhension des sources de *N. cyriacigeorgica* sur le territoire français. Il est à noter que les *Nocardia* ont été très rarement détectées dans les eaux d'entrée et de sortie suggérant des dénombrements liés à un enrichissement dans les anthroposols et une faible re-mobilisation lors des périodes de temps de pluie. Pour compléter ce travail, de nouveaux outils diagnostics ont été développés et permettent un suivi simplifié des *N. cyriacigeorgica* par PCR quantitative, dans un extrait d'ADN de matrices environnementales. Cet outil a été utilisé sur les ADNs extraits du BR Django-Reinhardt. Ceci a permis de confirmer la présence de *N. cyriacigeorgica* et d'obtenir un premier aperçu des concentrations ( $10^4$  -  $10^5$  équivalent génome par g de sédiment sec).

#### Dynamiques spatio-temporelles BI

Les travaux présentés dans cette partie s'inscrivent dans le cadre d'une thèse débutée en octobre 2015. Les résultats suivants sont donc préliminaires, et nécessiteront des validations complémentaires. Les variations des concentrations en *E. coli*, coliformes, entérocoques intestinaux et *Nocardia* ont été étudiées dans les anthroposols du BI Django-R en Novembre 2015, Avril et Juillet 2016. Des formes cultivables de *N. cyriacigeorgica* ont été retrouvées à une concentration de  $1,7.10^3$  bactéries/g de sol sec. Une collection d'environ 1000 souches a été constituée avec les bactéries *Nocardia*-like isolées du BI. Ces souches ont été identifiées à l'aide d'une technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) (Vautrin *et al.*, 2016).

Comme observé pour le BR, la température a eu un impact direct sur les dénombrements en entérocoques (Figure 23a). De plus, les caractéristiques physico-chimiques des sédiments (*i.e.* pH, granulométrie, humidité, taux de carbone et azote, HAP, végétation...) expliqueraient certaines variations dans les dénombrements

<sup>30</sup> Flahaut *et al.*, 1997. Canadian Journal of Microbiology. 43(8):699 708.

<sup>31</sup> Edmonds, 1976. Applied Environmental Microbiology. 32(4):537 46.

<sup>32</sup> Le Thi Nhi-Cong *et al.*, (2010). Journal of Basic Microbiology. 50(3):241–53.

d'entérocoques entre les zones du bassin, variant d'un facteur 2 à 10. La période de prélèvement serait le principal facteur explicatif des variations.

Afin d'aller plus loin dans ces résultats, une analyse méta-taxogénomique sera réalisée avec les marqueurs *rrs* et *tpm*. Pour l'étude des *Nocardia*, et plus largement des actinobactéries, un marqueur méta-taxogénomique *hsp65* est en cours de développement. Il devrait permettre une identification fine des actinobactéries pathogènes présentes dans l'environnement.

L'hétérogénéité spatiale du bassin d'infiltration ainsi que la saisonnalité semblent influencer les dénombrements en bactéries totales. Une estimation par PCRq ciblant le gène *rrs* (Figure 23b) des bactéries montre une variabilité tant spatiale que temporelle. Il semblerait tout de même que les variations spatiales soient le facteur le plus discriminant, notamment pour le cas de la zone haute, *i.e.* celle qui n'est que rarement en eau. C'est dans cette zone que les plus fortes variations d'abondances bactériennes sont observées, tant pour les communautés bactériennes totales, que pour les indicateurs de pollution fécale.

La virulence de souches environnementales de *Nocardia cyriacigeorgica* isolées des sédiments du BI de Django-Reinhardt a été comparée à celle d'une souche clinique de référence (*N. cyriacigeorgica* GUH-2 ; Beaman et al., 1978) dont la physiopathologie a déjà été largement étudiée. Cette étude a été réalisée sur un modèle murin d'immunodépression (Restagno et al., 2016)<sup>33</sup> en collaboration avec l'équipe APCSe de du campus Vétérinaire (VetAgro Sup, Marcy l'Etoile). Différentes doses de *N. cyriacigeorgica* ont été inoculées ( $10^6$  et  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Les premiers résultats montrent un pouvoir pathogène de la souche environnementale isolée du BI (EML) comparable à la souche clinique (GUH-2). Un taux de mortalité de 40% chez les souris injectées a été obtenu pour les deux souches. Une analyse génétique par génomique comparative et MLSA (16S rDNA, *hsp65*, *sodA* et *secA*) est en cours d'étude pour préciser les proximités phylétiques entre souches environnementales et cliniques (Vautrin et al., 2016). Une large collection de souches cliniques de l'OFN (Observatoire Français des Nocardioses, laboratoire de référence à Lyon qui est adossé à l'équipe BPOE) est utilisée dans ces comparatifs (Conférence - Bilan d'activités de l'Observatoire Français des Nocardioses (2014-juillet 2016) : analyse de 539 cas de nocardiose. RICAI, Paris. 12 et 13 décembre 2016). Ces analyses apporteront des éléments explicatifs concernant les réservoirs environnementaux de *N. cyriacigeorgica* contribuant à leur dissémination et susceptible de contribuer aux expositions humaines.

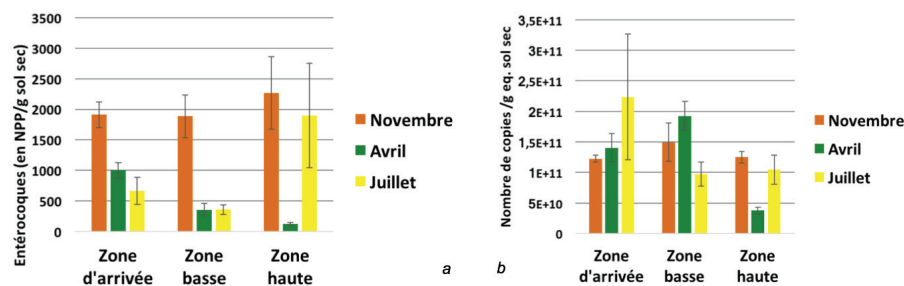


Figure 23 : Dénombrements (a) des entérocoques intestinaux (méthode culturale) et (b) des bactéries totales (PCRq ciblant le gène *rrs*) dans les anthroposols du BI Django-Reinhardt en fonction des zones de la Figure 17.

<sup>33</sup> Restagno et al., 2016. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0162109

e) Production scientifique associée (publications 2013-2016)

- Lipeme Kouyi G., Cren-Olivé C., Cournoyer B. 2014. Chemical, microbiological, and spatial characteristics and impacts of contaminants from urban catchments. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(8) 5263-5266.
- Sebastian C., Barraud S., Ribun S., Zoropogui A., Blaha D., Becouze-Lareure C., Lipeme Kouyi G., Cournoyer. (2014). Accumulated sediments in a detention basin: chemical and microbial hazards assessment linked to hydrological processes. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(8), 5367-5378.
- Marti, R., Bernardin C., Bécouze C., Ribun S., Marjolet L., Gleizal A., Aubin J.-B., Barraud S., Lipeme Kouyi G., Wiest L., Blaha D., Cournoyer B. (2016). Bacteriome genetic diversity changes among trapped urban sediments mobilized by runoffs are impacted by chemical pollutants. Sc. Report, en préparation
- Marti, R., Michallon J., Ribun S., Marjolet L., Gleizal A., Toussaint J-Y, Vareilles S., Cournoyer B. (2015). Évaluation de la diversité des espèces du genre *Pseudomonas* par meta-taxogénomique : Contexte d'un bassin versant industriel. GDR *Pseudomonas*, Bourgogne 2015.
- Bernardin C., Bécouze C., Gonzalez-Merchan C. Barraud S., Blaha D., Cournoyer B. (2014). Caractérisation microbiologique et risques sanitaires associés aux dépôts sédimentaires dans le Bassin de rétention de Django-Reinhardt (Chassieu, Rhône)- Journées doctorales de l'Hydrologie Urbaine Juillet 2014.
- Bernardin C., Blaha D., Barraud S., Cournoyer B. (2016). Distribution spatio-temporelle des pathogènes d'un bassin de rétention en fonction de la composition chimique des sédiments. 9e conférence internationale Novatech, Lyon, 28 juin – 1er juillet 2016. 4 p.
- Lipeme Kouyi G., Marti R., Toussaint J.-Y., Perrodin Y., Aubin J.-B., Becouze-Lareure C., Wiest L., Barraud S., Vareilles S., Gleizal A., Gonzalez-Merchan C., Cournoyer B. (2016). Intérêt de la pluralité scientifique pour identifier les sources et mieux caractériser les sédiments des bassins de retenue - Exemple du projet ANR Cabrres. 9e conférence internationale Novatech, Lyon, 28 juin – 1er juillet 2016.
- Vautrin et al., 2016. *Nocardia*, un pathogène au fil de l'eau. Journée FST- Université Lyon 1. « l'eau dans tous ses états », Lyon, 21 juin 2016.
- Lipeme Kouyi G., R. Marti, B. Misery, C. Bernardin, J.-Y. Toussaint, Y. Perrodin, J.-B. Aubin, C. Becouze-Lareure, L. Wiest, S. Barraud, D. Blaha, S. Vareilles, A. Gleizal, C. Gonzales-Merchan, C. Bazin, B. Cournoyer. 2016. Sources, évolution et gestion des contaminants urbains véhiculés par les eaux de ruissellement – une approche interdisciplinaire. U. Lyon 1. Lyon, Conférence « l'eau dans tous ses états », 21 juin 2016.
- Vautrin et al., 2016. *Nocardia*, un nouvel indicateur de pollution anthropique. JDHU (Journées Doctorales en Hydrologie Urbaine), Nantes. 11 et 12 octobre 2016.
- Vautrin et al., 2016. *Nocardia cyriacigeorgica*, de l'environnement au patient. RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris. 12 et 13 décembre 2016.
- Vautrin et al., 2016. Identification des *Nocardia* par spectrométrie de masse BrukerBiotyper. RICAI, Paris. 12 et 13 décembre 2016
- Durand T., Vautrin F., Chanard E., Mallet B., Bergeron E., Laurent F., Dauwalder O., Rodriguez-Nava V. Identification des *Nocardia* par spectrométrie de masse BrukerBiotyper. RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris. 12 et 13 décembre 2016.
- Rodriguez-Nava V. & Bergeron E. Bilan d'activité de l'Observatoire Français des Nocardioses (2014-juillet 2016) : analyse de 539 cas de nocardiose. RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris. 12 et 13 décembre 2016.



#### f) Collaborations nationales, internationales et Programmes de recherche supplémentaires ayant servi de support

(1) Projet IMU-MIC (coord. B. Coumoyer), et Allocation doctorale IMU – C. Bernardin (resp. D. Blaha et S. Barraud), labex IMU ; Projet ANR CESA Cabres (coord. G. Lipeme Kouyi); Allocation doctorale Région Auvergne Rhône-Alpes – F. Vautrin (resp. V. Rodriguez-Nava et T. Winiarski)

(2) Collaboration VetAgro Sup – campus vétérinaire, équipe Aggressions Pulmonaires et Circulatoires dans le Sepsis. Sujet : Virulence de souches environnementales et cliniques de *Nocardia* sur modèle murin d'immunodépression.

#### g) Perspectives

Les observations suggérant une évolution des bactériomes des anthroposols des BR vers des structures similaires après une période de maturation doivent être vérifiées par des études sur une période de temps plus longue, et/ou en analysant d'autres BR. Les analyses des jeux de données tpm pour l'ensemble des périodes de prélèvement du BR entre 2010 et 2015 permettront de préciser les limites de cette reproductibilité en augmentant la profondeur des classifications jusqu'au niveau des espèces et sous-espèces. Les premières analyses des données tpm tendent à confirmer une évolution des structures 2013 - 2015 puis vers l'organisation 2012, observée avant curage. Cette meilleure connaissance de l'écologie des peuplements bactériens du BR pourrait permettre de définir les temps de maturation des anthroposols nécessaires avant de procéder à un curage. Il est à noter que ces anthroposols matures pourraient être associés à une meilleure épuration des polluants chimiques. Il serait donc souhaitable d'étudier l'efficacité d'épuration des anthroposols en fonction de leur bactériome.

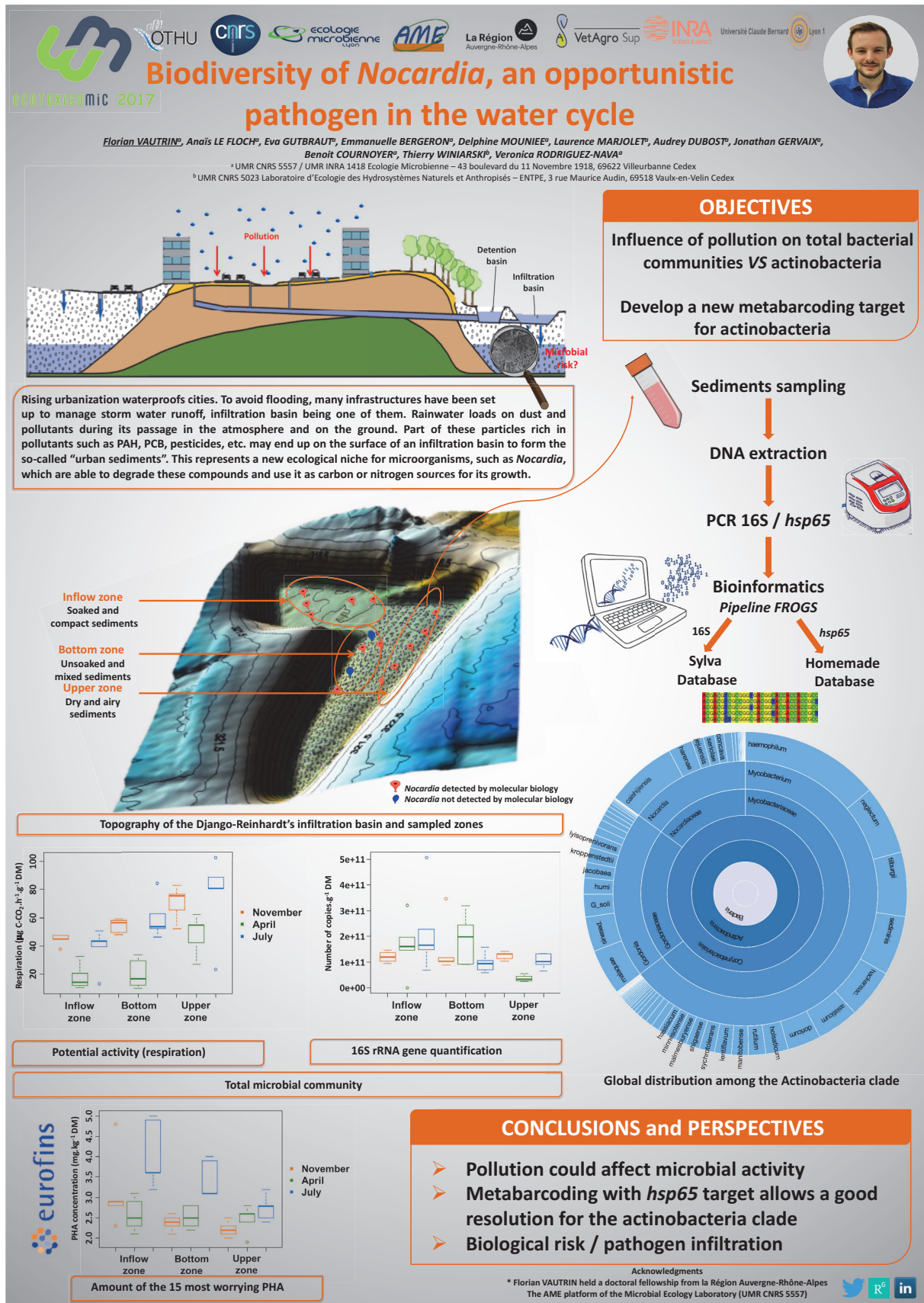
Des analyses des phénomènes de résistance des bactériomes d'anthroposols matures face à une installation de certaines espèces pathogènes indésirables seraient possibles. Des antagonismes entre espèces pourraient être à l'origine de cette résistance. Une meilleure connaissance de ces antagonismes permettrait de développer un concept de « contrôle biologique » des populations indésirables au sein d'un BR, et potentiellement d'un BI. Certains taxa bactériens pourraient faire l'objet d'inoculation pour lutter contre des enrichissements de certaines espèces (e.g. lutte biologique contre *P. aeruginosa*).

## A RETENIR

Les sédiments d'un BR accumulent des particules ayant des composantes bactériennes très diversifiées mais représentatives de la complexité des habitats ou pollutions en amont d'un BV. L'analyse du bactériome via l'étude des séquences du 16S rDNA des sédiments a permis l'identification des taxa les plus abondants dans ce type de dispositif. Les BR sont dominés par des bactéries ayant un tropisme reconnu pour les milieux aquatiques comme les *Flavobacterium* et *Aquabacterium* mais également des bactéries référencées dans les sols e.g. *Peredibacter* et *Paludibacter*. Certains genres fortement prévalents dans les contaminations fécales d'un réseau unitaire tels qu'*Acidovorax* et *Acinetobacter* ont également été retrouvés de façon significative.

Des genres pouvant inclure des formes pathogènes ont été référencés : *Mycobactéries* > *Pseudomonas* > *Acinetobacter* > *Aeromonas* > *Nocardia* > *Enterococcus* > *Escherichia* > *Staphylococcus* > *Streptococcus*. Les marqueurs tpm et hsp65 ont été développés pour approfondir les niveaux de classification au sein de certains de ces groupes. Le marqueur tpm a permis de dresser des bilans concernant la répartition des espèces de *Pseudomonas* et *Aeromonas* dans un BR dont les formes pathogènes. Ces données ont induit un suivi par l'observatoire de certains indicateurs bactériens : *Escherichia coli*, entérocoques, *Nocardia*, *N. cyriacigeorgica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas caviae*.

Les analyses des variations spatiales et temporelles des indicateurs bactériens ont permis d'observer des dynamiques impactées par les forçages environnementaux. Les périodes estivales avec température élevée seraient susceptibles de favoriser l'accumulation voire le développement de certaines de ces bactéries. Cette observation permet de recommander un curage des sédiments en période hivernale. De plus, les corrélations positives entre les dénombrements et le contenu en eau des sédiments suggèrent qu'il serait préférable d'effectuer ces curages après une période de temps sec.







## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## A

- Abdel-Monem MH, Dewedar A, Hussein M, Mansour S. 1991. Study on the pathogenicity of some *Nocardia* spp isolated from tap water of Ismailia City, Egypt. J Egypt Public Health Assoc 66: 135–144.
- Aggarwal D, Garg K, Chander J, Saini V, Janmeja AK. 2015. Pulmonary nocardiosis revisited: A case series. Lung India Off Organ Indian Chest Soc 32:165–168; <https://doi.org/10.4103/0970-2113.152638>.
- Aggarwal A, Parai MK, Shetty N, Wallis D, Woolhiser L, Hastings C, et al. 2017. Development of a novel lead that targets *M. tuberculosis* polyketide synthase 13. Cell 170:249-259.e25; <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.025>.
- Aghamirian MR, Ghiasian SA. 2009. Isolation and characterization of medically *Actinomycetes* in soil of Iran (2006-2007). Open Microbiol J 3:53–57; <http://doi.org/10.2174/1874285800903010053>.
- Akcaglar S, Ersoy C, Yilmaz E, Heper Y, Alver O, Akalin H, et al. 2008. *Nocardia cyriacigeorgica*: pulmonary infection in a patient with Basedow–Graves disease and a short review of reported cases. Int J Infect Dis 12:335–338; <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.06.014>.
- Albuquerque de Barros E, Manfio G, Ribeiro Maitan V, Mendes Bataus L, Bum Kim S, Maldonado L, et al. 2003. *Nocardia cerradoensis* sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. Int J Syst Evol Microbiol 53:29–33; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02020-0>.
- Alderman DJ, Feist SW, Polglase JL. 1986. Possible nocardiosis of crayfish, *Austropotamobius pallipes*. J Fish Dis 9:345–347; <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1986.tb01024.x>.
- Ali N, Dashti N, Al-Mailem D, Eliyas M, Radwan S. 2012. Indigenous soil bacteria with the combined potential for hydrocarbon consumption and heavy metal resistance. Environ Sci Pollut Res 19:812–820; <http://doi.org/10.1007/s11356-011-0624-z>.
- Almakki A, Jumas-Bilak E, Marchandin H, Licznar-Fajardo P. 2019. Antibiotic resistance in urban runoff. Sci Total Environ 667:64–76; <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.183>.
- Alonso L, Pommier T, Kaufmann B, Dubost A, Chapulliot D, Doré J, et al. 2019. Anthropization level of Lascaux Cave microbiome shown by regional-scale comparisons of pristine and anthropized caves. Mol Ecol 28:3383–3394; <https://doi.org/10.1111/mec.15144>.
- Alvarez A, Saez JM, Davila Costa JS, Colin VL, Fuentes MS, Cuozzo SA, et al., 2017. Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. Chemosphere 166:41–62; <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.070>.
- Ambaye A, Kohner PC, Wollan PC, Roberts KL, Roberts GD, Cockerill FR. 1997. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric

- methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. J Clin Microbiol 35: 847–852.
- Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. 2010. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. Infection 38:89–97; <http://doi.org/10.1007/s15010-009-9193-9>.
- Anagnostou T, Arvanitis M, Kourkoumpetis TK, Desalermos A, Carneiro HA, Mylonakis E. 2014. Nocardiosis of the central nervous system: experience from a general hospital and review of 84 cases from the literature. Medicine (Baltimore) 93:19–32; <http://doi.org/10.1097/MD.0000000000000012>.
- Angeletti S. 2017. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. J Microbiol Methods 138:20–29; <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>.
- Arjun R, Padmanabhan A, Reddy Attunuru BP, Gupta P. 2016. Disseminated nocardiosis masquerading as metastatic malignancy. Lung India Off Organ Indian Chest Soc 33:434–438; <http://doi.org/10.4103/0970-2113.184920>.
- Arrache D, Zait H, Rodriguez-Nava V, Bergeron E, Durand T, Yahiaoui M, et al. 2018. Nocardiose cérébrale et pulmonaire à *Nocardia abscessus* chez un patient algérien immunocompétent. J Mycol Médicale 28:531–537; <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.04.010>.
- Astudillo L, Dahan S, Escourrou G, Sailer L, Carreiro M, Ollier S, et al. 2001. Cat scratch responsible for primary cutaneous *Nocardia asteroides* in an immunocompetent patient. Br J Dermatol 145:684–685; <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2001.04447.x>.
- Azzout Y, Barraud S, Cres FN, Alfakih E. 1994. *Techniques alternatives en assainissement pluvial: choix, conception, réalisation et entretien*. Technique et documentation-Lavoisier. Tec et doc.

## B

- Babcsányi I, Meite F, Imfeld G. 2017. Biogeochemical gradients and microbial communities in Winogradsky columns established with polluted wetland sediments. FEMS Microbiol Ecol 93; <https://doi.org/10.1093/femsec/fix089>.
- Badin AL, Monier A, Volatier L, Geremia RA, Delolme C, Bedell J-P. 2011. Structural stability, microbial biomass and community composition of sediments affected by the hydric dynamics of an urban stormwater infiltration basin: Dynamics of physical and microbial characteristics of stormwater sediment. Microb Ecol 61:885–897; <http://doi.org/10.1007/s00248-011-9829-4>.
- Badin A-L, Mustafa T, Bertrand C, Monier A, Delolme C, Geremia RA, et al., 2012. Microbial communities of urban stormwater sediments: the phylogenetic structure of bacterial

- communities varies with porosity. FEMS Microbiol Ecol 81:324–338; <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01354.x>.
- Bai J-L, Wang Y, Qin S, Ding P, Xing K, Yuan B, *et al.* 2016. *Nocardia jiangsuensis* sp. nov., an actinomycete isolated from coastal soil. Int J Syst Evol Microbiol 66:4633–4638; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001402>.
- Bardonnet A, Bayle M, Boiron P. 2011. *Etude de la nocardiose. [Texte imprimé] : diagnostic et suivi épidémiologique de 485 cas français sur la période 2000-2008*.
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, *et al.*, 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. Microbiol Mol Biol Rev 80:1–43; <http://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>.
- Barraud S, Gibert J, Winiarski T, Bertrand Krajewski J-L. 2002. Implementation of a monitoring system to measure impact of stormwater runoff infiltration. Water Sci Technol 45:203–210; <http://doi.org/10.2166/wst.2002.0080>.
- Barry DP, Beaman BL. 2007. *Nocardia asteroides* strain GUH-2 induces proteasome inhibition and apoptotic death of cultured cells. Res Microbiol 158:86–96; <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.001>.
- Bawa B, Bai J, Whitehair M, Purvis T, DeBey BM. 2010. Bovine abortion associated with *Nocardia farcinica*. J Vet Diagn Invest 22:108–111; <https://doi.org/10.1177/104063871002200122>.
- Beaman BL. 1996. Differential binding of *Nocardia asteroides* in the murine lung and brain suggests multiple ligands on the nocardial surface. Infect Immun 64:4859–4862.
- Beaman BL, Beaman L. 1998. Filament tip-associated antigens involved in adherence to and invasion of murine pulmonary epithelial cells *in vivo* and HeLa cells *in vitro* by *Nocardia asteroides*. Infect Immun 66:4676–4689.
- Beaman BL, Bourgeois AL. 1981. Cell wall modification resulting from *in vitro* induction of L-phase variants of *Nocardia asteroides*. 148:10.
- Beaman BL, Maslan S. 1977. Effect of cyclophosphamide on experimental *Nocardia asteroides* infection in mice. Infect Immun 16:995–1004.
- Beaman BL, Maslan S. 1978. Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. Infect Immun 20:290–295. Beaman BL. 1980. Induction of L-phase variants of *Nocardia caviae* within intact murine lungs. INFECT IMMUN 29: 8.
- Beaman BL, Gershwin ME, Ahmed A, Scates SM, Deem R. 1982. Response of CBA/N x DBA2/F1 mice to *Nocardia asteroides*. INFECT IMMUN 35: 6.
- Beaman BL, Maslan S. 1977. Effect of cyclophosphamide on experimental *Nocardia asteroides* infection in mice. Infect Immun 16: 995–1004.

- Beaman BL, Tam S. 2008. An unusual murine behavior following infection with log-phase *Nocardia asteroides* type 6 strain GUH-2 (*Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2). *Microbes Infect* 10:840–843; <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.04.007>.
- Beaman L, Beaman BL. Differences in the interactions of *Nocardia asteroides* with macrophage, endothelial, and astrocytoma cell lines. 12.
- Beaman BL, Tam S. 2008. An unusual murine behavior following infection with log-phase *Nocardia asteroides* type 6 strain GUH-2 (*Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2). *Microbes Infect* 10:840–843; <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.04.007>.
- Beaman L, Beaman BL. 1990. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infect Immun* 58:3122–3128.
- Becker K, Sander P. 2016. *Mycobacterium tuberculosis* lipoproteins in virulence and immunity – fighting with a double-edged sword. *FEBS Lett* 590:3800–3819; <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12273>.
- Bedell J-P, Mourier B, Provot J, Winiarski T. 2013. Influences on the establishment and dominance of vegetation in stormwater infiltration basins. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res* 68:2576–2583; <http://doi.org/10.2166/wst.2013.526>.
- Bernardin-Souibgui C, Barraud S, Bourgeois E, Aubin J-B, Becouze-Lareure C, Wiest L, *et al.*, 2018. Incidence of hydrological, chemical, and physical constraints on bacterial pathogens, *Nocardia* cells, and fecal indicator bacteria trapped in an urban stormwater detention basin in Chassieu, France. *Environ Sci Pollut Res* 25:24860–24881; <http://doi.org/10.1007/s11356-018-1994-2>.
- Bernardin-Souibgui C, Zoropogui A, Voisin J, Ribun S, Vasselon V, Pujic P, *et al.*, 2017. Virulence test using nematodes to prescreen *Nocardia* species capable of inducing neurodegeneration and behavioral disorders. *PeerJ* 5:e3823; <http://doi.org/10.7717/peerj.3823>.
- Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, Ros A, Lucht F, Pozzetto B. 2005. Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathol Biol* 53:341–348; <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.09.006>.
- Blackall LL, Tandoi V, Jenkins D. 1991. Continuous culture studies with *Nocardia amarae* from activated sludge and their implications for *Nocardia* foaming control. *Water Pollut Control Fed* 63:44–50; <http://doi.org/10.2307/25043950>.
- Blosser SJ, Drake SK, Andrasko JL, Henderson CM, Kamboj K, Antonara S, *et al.* 2016. Multicenter matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry study for identification of clinically relevant *Nocardia* spp. G.A. Land, ed *J Clin Microbiol* 54:1251–1258; <https://doi.org/10.1128/JCM.02942-15>.

- Bonds AC, Sampson NS. 2018. More than cholesterol catabolism: regulatory vulnerabilities in *Mycobacterium tuberculosis*. Curr Opin Chem Biol 44:39–46; <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.012>.
- Bosamiya S, Vaishnani J, Momin A. 2011. Sporotrichoid nocardiosis with cutaneous dissemination. Indian J Dermatol Venereol Leprol 77:535; <https://doi.org/10.4103/0378-6323.82409>.
- Boukerb AM, Rousset A, Galanos N, Méar J-B, Thépaut M, Grandjean T, et al. 2014. Antiadhesive Properties of Glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. J Med Chem 57:10275–10289; <https://doi.org/10.1021/jm500038p>.
- Bourgeois L, Beaman BL. 1976. *In vitro* spheroplast and L-form induction within the pathogenic *Nocardiae*. J bacteriol 127:584–594.
- Brisse S. 2018. Taxonomie bactérienne. In: *Précis de bactériologie clinique*. Paris.
- Brombach H, Weiss G, Fuchs S. A new database on urban runoff pollution: Coparison of separate and combined sewer systems.
- Bross J, Gordon G. 1991. Nocardial meningitis: case reports and review. Rev Infect Dis 13: 160–165.
- Brosnahan C, Humphrey S, Knowles G, Ha H, Pande A, Jones J. 2017. Nocardiosis in freshwater reared Chinook salmon ( *Oncorhynchus tshawytscha* ). N Z Vet J 65:214–218; <https://doi.org/10.1080/00480169.2017.1314794>.
- Brown JM, Pham KN, McNeil MM, Lasker BA. 2004. Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. J Clin Microbiol 42:3655–3660; <http://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3655-3660.2004>.
- Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev 19:259–282; <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.259-282.2006>.
- Brown-Elliott BA, Conville P, Wallace RJ. 2015. Current status of *Nocardia* taxonomy and recommended identification methods. Clin Microbiol Newsl 37:25–32; <http://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2015.01.007>.
- Bryant PA, Baddley JW. 2017. Opportunistic infections in biological therapy, risk and prevention. Rheum Dis Clin N Am 43:27–41; <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2016.09.005>.

## C

- Camas M, Veyisoglu A, Sahin N. 2014. *Nocardia sungurluensis* sp. nov., isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol 64:1629–1634; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.051334-0>.



- Camassa S, Palucci I, Iantomasi R, Cubeddu T, Minerva M, De Maio F, *et al.* 2017. Impact of *pe\_pgrs33* gene polymorphisms on *Mycobacterium tuberculosis* infection and pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 7; <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00137>.
- Carella F, Carrasco N, Andree KB, Lacuesta B, Furones D, De Vico G. 2013. Nocardiosis in Mediterranean bivalves: First detection of *Nocardia crassostreae* in a new host *Mytilus galloprovincialis* and in *Ostrea edulis* from the Gulf of Naples (Italy). *J Invertebr Pathol* 114:324–328; <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.001>.
- Cargill JS, Boyd GJ, Weightman NC. 2010. *Nocardia cyriacigeorgica*: a case of endocarditis with disseminated soft-tissue infection. *J Med Microbiol* 59:224–230; <http://doi.org/10.1099/jmm.0.011593-0>.
- Carrasco G, de Dios Caballero J, Garrido N, Valdezate S, Cantón R, Sáez-Nieto JA. 2016. Shortcomings of the commercial MALDI-ToF MS database and use of MLSA as an arbiter in the identification of *Nocardia* species. *Front Microbiol* 7:542; <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00542>.
- Caumette P, Brochier C, Normand P. 2016. Taxonomie et phylogénie des Procaryotes. In: *Ecologie microbienne : microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Presses universitaires de Pau et des pays de l'Adour : 159-202.
- Chatrath S, Gupta VK, Dixit A, Garg LC. 2016. PE\_PGRS30 of *Mycobacterium tuberculosis* mediates suppression of proinflammatory immune response in macrophages through its PGRS and PE domains. *Microbes Infect* 18:536–542; <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.04.004>.
- Challis GL, Hopwood DA. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci* 100:14555–14561; <http://doi.org/10.1073/pnas.1934677100>.
- Chen W, Liu Y, Barkema HW, Gao J, De Buck J, Kastelic JP, *et al.* 2017. Short communication: Molecular characteristics, antimicrobial susceptibility, and pathogenicity of clinical *Nocardia cyriacigeorgica* isolates from an outbreak of bovine mastitis. *J Dairy Sci* 100:8414–8421; <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12680>.
- Chen W, Liu Y, Zhang L, Gu X, Liu G, Shahid M, *et al.* 2017. *Nocardia cyriacigeorgica* from bovine mastitis induced *in vitro* apoptosis of bovine mammary epithelial cells *via* activation of mitochondrial-caspase pathway. *Front Cell Infect Microbiol* 7:194; <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00194>.
- Chen Y-C, Lee C-H, Chien C-C, Chao T-L, Lin W-C, Liu J-W. 2013. Pulmonary nocardiosis in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 46:441–447; <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.07.017>.
- Chocat B. 1997. *Encyclopédie de l'hydrologie urbaine et de l'assainissement - Librairie Eyrolles*. 1124 p.

- Chocat B. 2015. Faut-il infiltrer les eaux pluviales ?
- Chong MN, Sidhu J, Aryal R, Tang J, Gernjak W, Escher B, *et al.* 2013. Urban stormwater harvesting and reuse: a probe into the chemical, toxicology and microbiological contaminants in water quality. *Environ Monit Assess* 185:6645–6652; <https://doi.org/10.1007/s10661-012-3053-7>.
- Chong PM, McCorrister SJ, Unger MS, Boyd DA, Mulvey MR, Westmacott GR. 2015. MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *J Microbiol Methods* 111:21–23; <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.024>.
- Chuard C, Erard V. 2011. Infections pulmonaires dues aux mycobactéries non tuberculeuses. *Rev Médicale Suisse* 7: 1982–1987.
- Chun J, Seong CN, Bae KS, Lee KJ, Kang SO, Goodfellow M, *et al.* 1998. *Nocardia flavorosea* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 3:901–905; <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-901>.
- Cilloniz C, Ewig S, Gabarrus A, Ferrer M, Casa JP de la B, Mensa J, *et al.*, 2017. Seasonality of pathogens causing community-acquired pneumonia. *Respirology* 22:778–785; <http://doi.org/10.1111/resp.12978>.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 26:547–603; <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>.
- Clark NM. 2009. *Nocardia* in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 9:S70–S77; <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02896.x>.
- Clarridge JE. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. 17: 840–862.
- Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Lee JW, Anderson VL, Fishbain JT, *et al.* 2004. *Nocardia kruczakiae* sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the “*N. nova* complex.” *J Clin Microbiol* 42:5139–5145; <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5139-5145.2004>.
- Conville PS, Zelazny AM, Witebsky FG. 2006. Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 44:2760–2766; <http://doi.org/10.1128/JCM.00155-06>.
- Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Brown-Elliott BA, Witebsky FG. 2008. *Nocardia wallacei* sp. nov. and *Nocardia blacklockiae* sp. nov., human pathogens and members of the “*Nocardia transvalensis* complex.” *J Clin Microbiol* 46:1178–1184; <https://doi.org/10.1128/JCM.02011-07>.

- Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. 2017. The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification. J Clin Microbiol 56; <https://doi.org/10.1128/JCM.01419-17>.
- Cuccui J, Milne TS, Harmer N, George AJ, Harding SV, Dean RE, et al. 2012. Characterization of the *Burkholderia pseudomallei* K96243 capsular polysaccharide I coding region. Infect Immun 80:1209–1221; <https://doi.org/10.1128/IAI.05805-11>.
- Cui Q, Wang L, Huang Y, Liu Z, Goodfellow M. 2005. *Nocardia jiangxiensis* sp. nov. and *Nocardia miyunensis* sp. nov., isolated from acidic soils. Int J Syst Evol Microbiol 55:1921–1925; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63644-0>.

## D

- Darzi MM, Mir MS, Nashiruddullah N, Kamil SA. 2006. Nocardiosis in domestic pigeons (*Columba livia*). Vet Rec 158:834–836; <https://doi.org/10.1136/vr.158.24.834>.
- Datry T, Malard F, Gibert J. 2004. Dynamics of solutes and dissolved oxygen in shallow urban groundwater below a stormwater infiltration basin. Sci Total Environ 329:215–229; <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.02.022>.
- Dechesne M, Barraud S, Bardin J-P. 2005. Experimental assessment of stormwater infiltration basin evolution. J Environ Eng 131:1090–1098; [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2005\)131:7\(1090\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2005)131:7(1090)).
- Dechesne M, Barraud S, Bardin J-P. 2004. Spatial distribution of pollution in an urban stormwater infiltration basin. J Contam Hydrol 72:189–205; <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2003.10.011>.
- Deem DA, Harrington DD. 1980. *Nocardia brasiliensis* in a horse with pneumonia and pleuritis. Cornell Vet 70: 321–328.
- Deem RL, Beaman BL, Gershwin ME. 1982. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. Infect Immun 38: 7.
- de Farias M, Werner J, Ribeiro M, Rodigheri S, Cavalcante C, Chi K, et al., 2012. Uncommon mandibular osteomyelitis in a cat caused by *Nocardia africana*. BMC Vet Res 8:239; <http://doi.org/10.1186/1746-6148-8-239>.
- Della Sala Gerardo, Hochmuth Thomas, Costantino Valeria, Teta Roberta, Gerwick William, Gerwick Lena, et al. 2013. Polyketide genes in the marine sponge *Plakortis simplex*: a new group of mono-modular type I polyketide synthases from sponge symbionts. Environ Microbiol Rep 5:809–818; <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12081>.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. 2013. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. Intensive Care Med 39:165–228; <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2769-8>.

- Deng W, Long Q, Zeng J, Li P, Yang W, Chen X, *et al.* 2017. *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS41 enhances the intracellular survival of *m. smegmatis* within macrophages via blocking innate immunity and inhibition of host defense. *Sci Rep* 7; <https://doi.org/10.1038/srep46716>.
- Devulder G, de Montclos MP, Flandrois JP. 2005. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:293–302; <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63222-0>.
- Devulder G, Perriere G, Baty F, Flandrois JP. 2003. BIBI, a Bioinformatics Bacterial Identification Tool. *J Clin Microbiol* 41:1785–1787; <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1785-1787.2003>.
- Dill J, Sanchez S, McDermott A, Camus A. 2017. Disseminated nocardiosis associated with the isolation of *Nocardia nova* in a longsnout seahorse *Hippocampus reidi* (Ginsburg). *J Fish Dis* 40:1235–1239; <https://doi.org/10.1111/jfd.12589>.
- Ding P, Bai J-L, Wang T-T, Sun Y, Cao C-L, Jiang J-H, *et al.* 2018. *Nocardia rhizosphaerihabitans* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a coastal soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:192–197; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002481>.
- Djouadi LN, Selama O, Abderrahmani A, Bouanane-Darenfed A, Abdellaziz L, Amziane M, *et al.* 2017. Multiresistant opportunistic pathogenic bacteria isolated from polluted rivers and first detection of nontuberculous mycobacteria in the Algerian aquatic environment. *J Water Health* 15:566–579; <https://doi.org/10.2166/wh.2017.309>.
- Domenis L, Pecoraro P, Spedicato R, Corvonato M, Peletto S, Zuccon F, *et al.* 2009. *Nocardia otitidiscaviarum* pneumonia in an Alpine chamois (*Rupicapra rupicapra rupicapra*). *J Comp Pathol* 141:70–73; <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.02.003>.
- Dunne WM, Doing K, Miller E, Miller E, Moreno E, Baghli M, *et al.* 2014. Rapid inactivation of *Mycobacterium* and *Nocardia* species before identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 52:3654–3659; <https://doi.org/10.1128/JCM.01728-14>.
- Durand T, Rodriguez-Nava V. 2019. *Évaluation des performances de la base de données V3 du spectromètre de masse MALDI-ToF Vitek MS® pour l'identification des bactéries du genre Nocardia*. Thèse, Lyon.

## E

- Elsayed S, Kealey A, Coffin CS, Read R, Megran D, Zhang K. 2006. *Nocardia cyriacigeorgica* septicemia. *J Clin Microbiol* 44:280–282; <https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.280-282.2006>.
- Engelsma M, Roozenburg I, Joly J. 2008. First isolation of *Nocardia crassostreae* from Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Europe. *Dis Aquat Organ* 80:229–234; <https://doi.org/10.3354/dao01938>.

- Eppinger H. 1890. Über eine neue pathogene *Cladothrix* und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis (cladothricia). Beitr Pathol Anat All. 9:287–328.
- Ercibengoa M, Bell M, Marimón JM, Humrighouse B, Klenk H-P, Pötter G, *et al.* 2016. *Nocardia donostiensis* sp. nov., isolated from human respiratory specimens. Antonie Van Leeuwenhoek 109:653–660; <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0667-8>.
- Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, *et al.* 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinforma Oxf Engl 34:1287–1294; <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.
- Euzéby JP. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. Int J Syst Evol Microbiol 47:590–592; <http://doi.org/10.1099/00207713-47-2-590>.
- Everest GJ, Cook AE, le Roes-Hill M, Meyers PR. 2011. *Nocardia rhamnosiphila* sp. nov., isolated from soil. Syst Appl Microbiol 34:508–512; <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.03.006>.
- Exmelin L, Malbruny B, Vergnaud M, Boiron P, Morel C. 1996. Molecular study of nosocomial nocardiosis outbreak involving heart transplant recipients. J Clin Microbiol 34:1014–1016.
- Ezeoke I, Klenk H-P, Potter G, Schumann P, Moser BD, Lasker BA, *et al.* 2013. *Nocardia amikacinitolerans* sp. nov., an amikacin-resistant human pathogen. Int J Syst Evol Microbiol 63:1056–1061; <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.039990-0>.

## **F**

- Fang B, Han M-X, Zhang L-Y, Jiao J-Y, Zhang X, Zhang Z-T, *et al.* 2018. *Nocardia aurea* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a karstic subterranean environment. Int J Syst Evol Microbiol 69; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003122>.
- Fatahi M. 2016. Role of *Nocardia* in activated sludge. Malays J Med Sci 23:86–88.
- Fatahi-Bafghi M. 2018. Nocardiosis from 1888 to 2017. Microb Pathog 114:369–384; <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.012>.
- Favre-Bonte S, Ranjard L, Colinon C, Prigent-Combaret C, Nazaret S, Cournoyer B. 2005. Freshwater selenium-methylating bacterial thiopurine methyltransferases: diversity and molecular phylogeny. Environ Microbiol 7: 153–164.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783; <https://doi.org/10.2307/2408678>.
- Filice GA. 2005. Nocardiosis in persons with human immunodeficiency virus infection, transplant recipients, and large, geographically defined populations. J Lab Clin Med 145:156–162; <https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.01.002>.

- Filice GA, Beaman BL, Remington JS. 1980. Effects of activated macrophages on *Nocardia asteroides*. *INFECT IMMUN* 27: 7.
- Flateau C, Jurado V, Lemaitre N, Loiez C, Wallet F, Saiz-Jimenez C, et al. 2013. First case of cerebral abscess due to a novel *Nocardia* species in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol* 51:696–700; <https://doi.org/10.1128/JCM.00762-12>.
- Foulquier A, Simon L, Gilbert F, Fourel F, Malard F, Mermillod-Blondin F. 2009. Relative influences of DOC flux and subterranean fauna on microbial abundance and activity in aquifer sediments: new insights from <sup>13</sup>C-tracer experiments: Role of carbon supply and subterranean fauna on aquifer microorganisms. *Freshw Biol* 55:1560–1576; <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02385.x>.
- Freiberg JA, Saharia KK, Morales MK. 2019. An unusual case of *Nocardia cyriacigeorgica* presenting with spinal abscesses in a renal transplant recipient and a review of the literature. *Transpl Infect Dis* 21:e13025; <https://doi.org/10.1111/tid.13025>.
- Friedman CS, Beaman BL, Chun J, Goodfellow M, Gee A, Hedrick RP. 1998. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *Int J Syst Bacteriol* 48:237–246; <http://doi.org/10.1099/00207713-48-1-237>.

## G

- Galacho-Harriero A, Delgado-López PD, Ortega-Lafont MP, Martín-Alonso J, Castilla-Díez JM, Sánchez-Borge B. 2017. *Nocardia farcinica* brain abscess: report of 3 cases. *World Neurosurg* 106:1053.e15-1053.e24; <http://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.07.033>.
- García-Fernández J, Papavinasasundaram K, Galán B, Sasseti CM, García JL. 2017. Molecular and functional analysis of the mce4 operon in *Mycobacterium smegmatis*. *Environ Microbiol* 19:3689–3699; <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13869>.
- Gautier A. 1998. Contribution à la connaissance du fonctionnement d'ouvrages d'infiltration d'eau de ruissellement pluvial urbain. thesis, Lyon, INSA.
- George R. 2015. Use of siRNA molecular beacons to detect and attenuate mycobacterial infection in macrophages. *World J Exp Med* 5:164; <https://doi.org/10.5493/wjem.v5.i3.164>.
- Georghiou PR, Blacklock ZM. 1992. Infection with *Nocardia* species in Queensland: A review of 102 clinical isolates. *Med J Aust* 156:692–697; <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1992.tb121509.x>.
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, et al., 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3:733–739; <http://doi.org/10.1038/nrmicro1236>.
- Ghittino P, Penna R. 1968. Microbiologic study on nocardiosis in rainbow trout. *Bull - Off Int Epizoot* 69: 1045–1056.



- Ghodhbane-Gtari F, Nouioui I, Salem K, Ktari A, Montero-Calasanz M del C, Tisa LS, *et al.* 2014. *Nocardia casuarinae* sp. nov., an actinobacterial endophyte isolated from root nodules of *Casuarina glauca*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105:1099–1106; <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0168-6>.
- Gielnik A, Pechaud Y, Huguenot D, Cébron A, Riom J-M, Guibaud G, *et al.* 2019. Effect of digestate application on microbial respiration and bacterial communities' diversity during bioremediation of weathered petroleum hydrocarbons contaminated soils. *Sci Total Environ* 670:271–281; <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.176>.
- Gilquin JM, Riviere B, Jurado V, Audouy B, Kouatche J-B, Bergeron E, *et al.* 2016. First case of actinomycetoma in France due to a novel *Nocardia* species, *Nocardia boironii* sp. nov. *mSphere* 1; <https://doi.org/10.1128/mSphere.00309-16>.
- Girard V, Mailler S, Polsinelli S, Jacob D, Saccomani MC, Celliere B, *et al.* 2017. Routine identification of *Nocardia* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 87:7–10; <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.09.024>.
- Girard V, Mailler S, Welker M, Arsac M, Cellière B, Cotte-Pattat P-J, *et al.* 2016. Identification of *Mycobacterium* spp. and *Nocardia* spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Diagn Microbiol Infect Dis* 86:277–283; <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.027>.
- Golinska P, Wang D, Goodfellow M. 2013. *Nocardia aciditolerans* sp. nov., isolated from a spruce forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103:1079–1088; <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9887-3>.
- Gonzalez-Merchan C, Barraud S, Le Coustumer S, Fletcher T. 2012. Monitoring of clogging evolution in the stormwater infiltration system and determinant factors. *Eur J Environ Civ Eng* 16:s34–s47; <https://doi.org/10.1080/19648189.2012.682457>.
- Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K. 2012. *Bergey's manual® of systematic bacteriology*. In Springer New York.
- Goodfellow M, Williams ST. 1983. Ecology of *Actinomycetes*. *Annu Rev Microbiol* 37:189–216; <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>.
- Goris J, Vandamme P, Klappenbach JA, Coenye T, Konstantinidis KT, Tiedje JM. 2007. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:81–91; <http://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>.
- Gorovtsov AV, Sazykin IS, Sazykina MA. 2018. The influence of heavy metals, polyaromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls pollution on the development of antibiotic resistance in soils. *Environ Sci Pollut Res* 25:9283–9292; <http://doi.org/10.1007/s11356-018-1465-9>.

- Grebel JE, Mohanty SK, Torkelson AA, Boehm AB, Higgins CP, Maxwell RM, *et al.* 2013. Engineered infiltration systems for urban stormwater reclamation. *Envir Engin Sc* 30(8). <https://doi.org/10.1089/ees.2012.0312>.
- Guo H, Gu J, Wang X, Tuo X, Yu J, Zhang R. 2019. Key role of cyromazine in the distribution of antibiotic resistance genes and bacterial community variation in aerobic composting. *Bioresour Technol* 274:418–424; <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.005>.
- Gupta RS. 2019. Commentary: genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria*. *Front Microbiol* 10:206; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00206>.
- Gürtler V, Smith R, Mayall BC, Pötter-Reinemann G, Stackebrandt E, Kroppenstedt RM. 2001. *Nocardia veterana* sp. nov., isolated from human bronchial lavage. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:933–936; <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-933>.

## H

- Hamid ME, Maldonado L, Sharaf Eldin GS, Mohamed MF, Saeed NS, Goodfellow M. 2001. *Nocardia africana* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with pulmonary infections. *J Clin Microbiol* 39:625–630; <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.625-630.2001>.
- Hashemi-Shahraki A, Heidarieh P, Bostanabad SZ, Hashemzadeh M, Feizabadi MM, Schraufnagel D, *et al.* 2016. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Nocardia* species among patients with nocardiosis. *Sci Rep* 5; <https://doi.org/10.1038/srep17862>.
- Hidri X & Rodriguez-Nava V. 2019. *Streptomyces*. In: J. Freney, F. Renaud, R. Leclercq, P. Riegel (Eds), *Précis de bactériologie clinique*, 3<sup>ème</sup> éd. Editions ESKA. 828–831.
- Hiltner L, Störmer K. 1903. Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlebstoff und nach Brache. 3:443–545.
- Hooper DC, Pruitt AA, Rubin RH. 1982. Central nervous system infection in the chronically immunosuppressed. *Medicine* 61: 166–188.
- Hoshino Y, Watanabe K, Iida S, Suzuki S, Kudo T, Kogure T, *et al.* 2007. *Nocardia terpenica* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1456–1460; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64695-0>.
- Hsueh P-R, Lee T-F, Du S-H, Teng S-H, Liao C-H, Sheng W-H, *et al.* 2014. Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* Species. *J Clin Microbiol* 52:2371–2379; <https://doi.org/10.1128/JCM.00456-14>.
- Hu J-Y, Li L, Peng G, Li Y-Q, Xu L-H, Guan H-L, *et al.* 2019. *Nocardia panacis* sp. nov., a novel actinomycete with antiphytopathogen activity isolated from the rhizosphere of *Panax*



*notoginseng*. Antonie Van Leeuwenhoek; <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01326-z>.

Huang J-R, Ming H, Duan Y-Y, Li S, Zhang L-Y, Ji W-L, *et al.* 2017. *Nocardia heshunensis* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:3467–3473; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002143>.

Huang M-J, Xiao M, Rao MPN, Cheng T, Yang Y-Y, Alkhalifah DHM, *et al.* 2018. *Nocardia zhihengii* sp. nov., an actinobacterium isolated from rhizosphere soil of *Psammosilene tunicoides*. Antonie Van Leeuwenhoek 111:2149–2156; <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1107-8>.

## I

Iida S, Kageyama A, Yazawa K, Uchiyama N, Toyohara T, Chohnabayashi N, *et al.* 2006. *Nocardia exalbida* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1193–1196; <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63850-0>.

Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H, Hotta K, *et al.*, 2004. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14925–14930; <http://doi.org/10.1073/pnas.0406410101>.

Isik K, Chun J, Chi Y, Goodfellow M. 1999a. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. *Int J Syst Evol Microbiol* 49:833–837; <http://doi.org/10.1099/00207713-49-2-833>.

Isik K, Chun J, Hah YC, Goodfellow M. 1999b. *Nocardia uniformis* nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 3:1227–1230; <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1227>.

Iyer PKR, Rao PP. 1971. Suspected pulmonary nocardiosis in a duck. *Med Mycol* 9:79–80; <https://doi.org/10.1080/00362177185190201>.

## J

Jannat-Khah D, Kroppenstedt RM, Klenk H-P, Spröer C, Schumann P, Lasker BA, *et al.* 2010. *Nocardia mikamii* sp. nov., isolated from human pulmonary infections in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2272–2276; <https://doi.org/10.1099/ijms.0.015594-0>.

Jasmin AM, Powell CP, Baucom JN. 1972. Actinomycotic mycetoma in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) due to *Nocardia paraguayensis*. *Vet Med Small Anim Clin VM SAC* 67: 542–543.

Jones AL, Fisher AJ, Mahida R, Gould K, Perry JD, Hannan MM, *et al.* 2014. *Nocardia kroppenstedtii* sp. nov., an actinomycete isolated from a lung transplant patient with a pulmonary infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:751–754; <https://doi.org/10.1099/ijms.0.048330-0>.

Jurado V, Boiron P, Kroppenstedt RM, Laurent F, Couble A, Laiz L, *et al.* 2008. *Nocardia altamirensis* sp. nov., isolated from Altamira cave, Cantabria, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2210–2214; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65482-0>.

## K

Kaewkla O, Franco CMM. 2010. *Nocardia callitridis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized root of an Australian native pine tree. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1532–1536; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016337-0>.

Kageyama A. 2004a. *Nocardia araoensis* sp. nov. and *Nocardia pneumoniae* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2025–2029; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63074-0>.

Kageyama A. 2004b. *Nocardia asiatica* sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:125–130; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02676-0>.

Kageyama A, Suzuki S, Yazawa K, Nishimura K, Kroppenstedt RM, Mikami Y. 2004a. *Nocardia aobensis* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Microbiol Immunol* 48:817–822; <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03613.x>.

Kageyama A, Torikoe K, Iwamoto M, Masuyama J-I, Shibuya Y, Okazaki H, *et al.* 2004b. *Nocardia arthritidis* sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with rheumatoid arthritis in Japan. *J Clin Microbiol* 42:2366–2371; <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2366-2371.2004>.

Kageyama A. 2004. *Nocardia araoensis* sp. nov. and *Nocardia pneumoniae* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2025–2029; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63074-0>.

Kageyama A, Poonwan N, Yazawa K, Suzuki S, Kroppenstedt RM, Mikami Y. 2004a. *Nocardia vermiculata* sp. nov. and *Nocardia thailandica* sp. nov. isolated from clinical specimens. *Actinomycetologica* 18:27–33; [https://doi.org/10.3209/saj.18\\_27](https://doi.org/10.3209/saj.18_27).

Kageyama A, Yazawa K, Mukai A, Kinoshita M, Takata N, Nishimura K, *et al.* 2004b. *Nocardia shimofusensis* sp. nov., isolated from soil, and *Nocardia higoensis* sp. nov., isolated from a patient with lung nocardiosis in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1927–1931; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63061-0>.

Kageyama A, Yazawa K, Nishimura K, Mikami Y. 2004c. *Nocardia inohanensis* sp. nov., *Nocardia yamanashiensis* sp. nov. and *Nocardia niigatensis* sp. nov., isolated from

- clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol 54:563–569; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02794-0>.
- Kageyama A, Yazawa K, Nishimura K, Mikami Y. 2004d. *Nocardia testaceus* sp. nov. and *Nocardia senatus* sp. nov., isolated from patients in Japan. Microbiol Immunol 48:271–276; <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03523.x>.
- Kageyama A, Yazawa K, Taniguchi H, Chibana H, Nishimura K, Kroppenstedt RM, et al. 2005. *Nocardia concava* sp. nov., isolated from Japanese patients. Int J Syst Evol Microbiol 55:2081–2083; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63280-0>.
- Kageyama A, Yazawa K, Nishimura K, Mikami Y. 2005. *Nocardia anaemiae* sp. nov. isolated from an immunocompromised patient and the first isolation report of *Nocardia vinacea* from humans. Jpn J Med Mycol 46:21–26; <https://doi.org/10.3314/jjmm.46.21>.
- Kämpfer P, Buczolits S, Jäckel U, Grün-Wollny I, Busse H-J. 2004. *Nocardia tenerifensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 54:381–383; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02841-0>.
- Kämpfer P, Huber B, Buczolits S, Thummes K, Grün-Wollny I, Busse H-J. 2007. *Nocardia acidivorans* sp. nov., isolated from soil of the island of Stromboli. Int J Syst Evol Microbiol 57:1183–1187; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64813-0>.
- Kämpfer P, Lodders N, Grün-Wollny I, Martin K, Busse H-J. 2012. *Nocardia grenadensis* sp. nov., isolated from sand of the Caribbean Sea. Int J Syst Evol Microbiol 62:693–697; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030684-0>.
- Khan S, Islam A, Hassan MdI, Ahmad F. 2016. Purification and structural characterization of Mce4A from *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Biol Macromol 93:235–241; <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.059>.
- Khan ZU, Al-Sayer H, Chugh TD, Chandy R, Provost F, Boiron P. 2000. Antimicrobial susceptibility profile of soil isolates of *Nocardia asteroides* from Kuwait. Clin Microbiol Infect 6:94–98; <http://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00026.x>.
- Khan ZU, Neil L, Chandy R, Chugh TD, Al-Sayer H, Provost F, et al., 1997. *Nocardia asteroides* in the soil of Kuwait. Mycopathologia 137:159–163.
- Khot PD, Couturier MR, Wilson A, Croft A, Fisher MA. 2012. Optimization of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis for bacterial identification. J Clin Microbiol 50:3845–3852; <https://doi.org/10.1128/JCM.00626-12>.
- Kim D, Kim Y-S, Kim S-K, Kim SW, Zylstra GJ, Kim YM, et al., 2002. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. Appl Environ Microbiol 68:3270–3278; <http://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3270-3278.2002>.
- Kim KK, Roth A, Andrees S, Lee ST, Kroppenstedt RM. 2002. *Nocardia pseudovaccinii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 52:1825–1829; <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1825>.

- Kim S-J, Kweon O, Cerniglia CE. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Mycobacterium* strains. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (K.N. Timmis, ed). Springer Berlin Heidelberg. 1865–1879.
- Kim BS, Park JW, Kang GS, Jin JH, Roh HJ, Kim DH, et al. 2018. First report of *Nocardia* infection in cultured Japanese eel, *Anguilla japonica*. J Fish Dis 41:1921–1927; <https://doi.org/10.1111/jfd.12882>.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16:111–120; <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Kinde H, Walker R, Skinner V, Daft B, Hughes R. 1992. Actinomycetales infections in slender-horned gazelles: six cases (1987–1989). J Am Vet Med Assoc 200: 1719–1722.
- Kinoshita N, Homma Y, Igarashi M, Ikeno S, Hori M, Hamada M. 2001. *Nocardia vinacea* sp. Actinomycetol 15:1–5; [https://doi.org/10.3209/saj.15\\_1](https://doi.org/10.3209/saj.15_1).
- Kobayashi J, Tsuda M, Nemoto A, Tanaka Y, Yazawa K, Mikami Y. 1997. Brasilidine A, a new cytotoxic isonitrile-containing indole alkaloid from the Actinomycete *Nocardia brasiliensis*. J Nat Prod 60:719–720; <http://doi.org/10.1021/np970132e>.
- Koehne GMA. 1972. Isolation of *Nocardia asteroides* from a pig. Mycopathol Mycol Appl 46:317–318; <https://doi.org/10.1007/BF02052127>.
- Kong F, Wang H, Zhang E, Sintchenko V, Xiao M, Sorrell TC, et al., 2010. *secA1* gene sequence polymorphisms for species identification of *Nocardia* species and recognition of intraspecies genetic diversity. J Clin Microbiol 48:3928–3934; <http://doi.org/10.1128/JCM.01113-10>.
- Kosova-Maali D, Bergeron E, Maali Y, Durand T, Gonzalez J, Mouniée D, et al. 2018. High intraspecific genetic diversity of *nocardia brasiliensis*, a pathogen responsible for cutaneous nocardiosis found in France: Phylogenetic relationships by using *sod* and *hsp65* genes. BioMed Res Int 2018:1–10; <https://doi.org/10.1155/2018/7314054>.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 33:1870–1874; <http://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

## L

- Lair S, Measures LN, Martineau D. 2016. Pathologic findings and trends in mortality in the beluga (*Delphinapterus leucas*) population of the St Lawrence estuary, Quebec, Canada, from 1983 to 2012. Vet Pathol 53:22–36; <http://doi.org/10.1177/0300985815604726>.

- Lamm AS, Khare A, Conville P, Lau PCK, Bergeron H, Rosazza JPN. 2009. *Nocardia iowensis* sp. nov., an organism rich in biocatalytically important enzymes and nitric oxide synthase. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2408–2414; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007427-0>.
- Lasker BA, Bell M, Klenk H-P, Spröer C, Schumann P, Brown JM. 2014. *Nocardia vulneris* sp. nov., isolated from wounds of human patients in North America. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:543–553; <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0226-0>.
- Lasker BA, Bell M, Klenk H-P, Schumann P, Brown JM. 2015. *Nocardia arizonensis* sp. nov., obtained from human respiratory specimens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108:1129–1137; <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0566-4>.
- Lassabatere L, Angulo-Jaramillo R, Goutaland D, Letellier L, Gaudet JP, Winiarski T, *et al.* 2010. Effect of the settlement of sediments on water infiltration in two urban infiltration basins. *Geoderma* 156:316–325; <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.02.031>.
- Lassabatere L, Spadini L, Delolme C, Février L, Galvez Cloutier R, Winiarski T. 2007. Concomitant Zn–Cd and Pb retention in a carbonated fluvio-glacial deposit under both static and dynamic conditions. *Chemosphere* 69:1499–1508; <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.053>.
- Laurent FJ, Provost F, Boiron P. 1999. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol* 37:99–102.
- Laurent F, Rodríguez-Nava V, Noussair L, Couble A, Nicolas-Chanoine M-H, Boiron P. 2007. *Nocardia ninae* sp. nov., isolated from a bronchial aspirate. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:661–665; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64476-0>.
- Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, Djadi-Prat J, Mouniée D, Boiron P, *et al.*, 2018. Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010–2015. *Clin Microbiol Infect* 25:489–495; <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.013>.
- Lebeaux D, Lanternier F, Degand N, Catherinot E, Podglajen I, Rubio M-T, *et al.* 2010. *Nocardia pseudobrasiliensis* as an emerging cause of opportunistic infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 48:656–659; <https://doi.org/10.1128/JCM.01244-09>.
- Lechevalier H, Lechevalier MP. 1965. Classification of aerobic *Actinomycetes* based on their morphology and their chemical composition. *Ann Inst Pasteur* 108:662–673.
- Lechevalier HA, Lechevalier MP. 1967. Biology of Actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 21:71–100; <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.21.100167.000443>.
- Le Coustumer S, Moura P, Barraud S, Clozel B, Varnier J-C. 2007. Temporal evolution and spatial distribution of heavy metals in a stormwater infiltration basin – estimation of the mass of trapped pollutants. *Water Sci Technol* 56:93–100; <https://doi.org/10.2166/wst.2007.761>.

- Lee SD. 2006. *Nocardia jejuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a natural cave on Jeju Island, Republic of Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:559–562; <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63866-0>.
- Le Roes M, Meyers PR. 2006. *Nocardia gamkensis* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90:291–298; <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9083-9>.
- Lévesque S, Dufresne PJ, Soualhine H, Domingo M-C, Bekal S, Lefebvre B, *et al.* 2015. A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. V. Chaturvedi, ed *PLOS ONE* 10:e0144878; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144878>.
- Li F, Feng L, Jin C, Wu X, Fan L, Xiong S, *et al.* 2018. LpqT improves mycobacteria survival in macrophages by inhibiting TLR2 mediated inflammatory cytokine expression and cell apoptosis. *Tuberculosis* 111:57–66; <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.05.007>.
- Li Q-Q, Han M-X, Fang B-Z, Jiao J-Y, Liu L, Yang Z-W, *et al.* 2017. *Nocardia cavernae* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a karst cave sample. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:2998–3003; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002072>.
- Li S, Ming H, Duan Y-Y, Huang J-R, Zhao Z-L, Zhang L-Y, *et al.* 2017. *Nocardia tengchongensis* sp. nov., isolated from a soil sample. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110:1149–1155; <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0887-6>.
- Liebenberg S, Giddens WJ. 1985. Disseminated nocardiosis in three macaque monkeys. *Lab Anim Sci* 35: 162–166.
- Liu WL, Lai CC, Ko WC, Chen YH, Tang HJ, Huang YL, *et al.* 2011. Clinical and microbiological characteristics of infections caused by various *Nocardia* species in Taiwan: a multicenter study from 1998 to 2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:1341–1347; <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1227-9>.
- Liu C, Bai L, Ye L, Zhao J, Yan K, Xiang W, *et al.* 2016a. *Nocardia lasii* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the cuticle of an ant (*Lasius fuliginosus* L). *Antonie Van Leeuwenhoek* 109:1513–1520; <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0753-y>.
- Liu C, Guan X, Xiang W, Wang X, Song J, Kong X, *et al.* 2016b. *Nocardia camponoti* sp. nov., an actinomycete isolated from the head of an ant (*Camponotus japonicus* Mayr). *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1900–1905; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000963>.
- Locci R. 1994. *Actinomycetes* as plant pathogens. *Eur J Plant Pathol* 100:179–200; <http://doi.org/10.1007/BF01876235>.
- Long P, Choi G, Silberman M. 1983. Nocardiosis in two pesquet's parrots (*Psitttrichas fulgidus*). *Avian Dis* 27:855; <https://doi.org/10.2307/1590332>.
- Lu J, Jin M, Nguyen SH, Mao L, Li J, Coin LJM, *et al.*, 2018. Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation. *Environ Int* 118:257–265; <http://doi.org/10.1016/j.envint.2018.06.004>.



- Lu LJ, Liu J. 2016. Human microbiota and ophthalmic disease. *Yale J Biol Med* 89: 325–330.
- Luo Q, Hiessl S, Poehlein A, Daniel R, Steinbüchel A. 2014a. Insights into the microbial degradation of rubber and gutta-percha by analysis of the complete genome of *Nocardia nova* SH22a. F.E. Loeffler, ed *Appl Environ Microbiol* 80:3895–3907; <http://doi.org/10.1128/AEM.00473-14>.
- Luo Q, Hiessl S, Steinbüchel A. 2014b. Functional diversity of *Nocardia* in metabolism. *Environ Microbiol* 16:29–48; <http://doi.org/10.1111/1462-2920.12221>.

## M

- Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268–281; <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- Maldonado L, Hookey JV, Ward AC, Goodfellow M. 2000. The *Nocardia salmonicida* clade, including descriptions of *Nocardia cummidelensis* sp. nov., *Nocardia fluminea* sp. nov. and *Nocardia soli* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78: 367–377.
- Maldonado LA, Hamid ME, Gamal El Din OA, Goodfellow M. 2004. *Nocardia farcinica* – a significant cause of mastitis in goats in Sudan. *Afr Vet Ass* 75: 147–149.
- Maraki S, Panagiotaki E, Tsopanidis D, Scoulica E, Miari N-M, Hainis K, *et al.* 2006. *Nocardia cyriacigeorgica* pleural empyema in an immunocompromised patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56:333–335; <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.05.001>.
- Marti R, Becouze-Lareure C, Ribun S, Marjolet L, Bernardin Souibgui C, Aubin J-B, *et al.*, 2017. Bacteriome genetic structures of urban deposits are indicative of their origin and impacted by chemical pollutants. *Scientific Reports* 7/13219; <http://doi.org/10.1038/s41598-017-13594-8>.
- Martin W, Koonin EV. 2006. Introns and the origin of nucleus–cytosol compartmentalization. *Nature* 440:41–45; <https://doi.org/10.1038/nature04531>.
- Martineau D, Measures LN, Lair S. 2016. Pathologic findings and trends in mortality in the beluga (*Delphinapterus leucas*) population of the St Lawrence estuary, Quebec, Canada, from 1983 to 2012. *Vet Pathol* 53:22–36; <https://doi.org/10.1177/0300985815604726>.
- Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. 2014. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of *Mycobacteria* using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol* 52:130–138; <http://doi.org/10.1128/JCM.01996-13>.



- Matos AC, Dias AP, Morais M, Matos M, Pinto ML, Coelho AC, et al. 2015. Granulomatous lymphadenitis caused by *Nocardia* species in hunted wild boar (*Sus scrofa*) in Portugal. Vet Rec 177:103.4-104; <https://doi.org/10.1136/vr.h3988>.
- Matsumoto T, Negishi T, Hamada M, Komaki H, Gonoi T, Yaguchi T. 2016. *Nocardia shinanonensis* sp. nov., isolated from a patient with endophthalmitis. Int J Syst Evol Microbiol 66:3324–3328; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001197>.
- Mazzaferri F, Cordioli M, Segato E, Adami I, Maccacaro L, Sette P, et al. 2018. *Nocardia* infection over 5 years (2011-2015) in an Italian tertiary care hospital. New Microbiologica 41: 136–140.
- McCarthy BJ, Bolton ET. 1963. An approach to the measurement of genetic relatedness among organisms. Proc Natl Acad Sci USA 50:156–164.
- McClure HM, Chang J, Kaplan W, Brown JM. 1976. Pulmonary nocardiosis in an orangutan. J Am Vet Med Assoc 169: 943–945.
- McGrane SJ. 2016. Impacts of urbanisation on hydrological and water quality dynamics, and urban water management: a review. Hydrol Sci J 61:2295–2311; <https://doi.org/10.1080/02626667.2015.1128084>.
- McMahon MD, Rush JS, Thomas MG. 2012. Analyses of MbtB, MbtE, and MbtF suggest revisions to the mycobactin biosynthesis pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 194:2809–2818; <https://doi.org/10.1128/JB.00088-12>.
- McTaggart LR, Chen Y, Poopalarajah R, Kus JV. 2018. Incubation time and culture media impact success of identification of *Nocardia* spp. by MALDI-ToF mass spectrometry. Diagn Microbiol Infect Dis 92:270–274; <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.016>.
- McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. 2010. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. J Clin Microbiol 48:4525–4533; <http://doi.org/10.1128/JCM.00883-10>.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics 14:60; <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>.
- Mejia AI, Moglen GE. 2009. Spatial patterns of urban development from optimization of flood peaks and imperviousness-based measures. J Hydrol Eng 14; [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)1084-0699\(2009\)14:4\(416\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1084-0699(2009)14:4(416)).
- Mesureur J, Arend S, Cellière B, Courault P, Cotte-Pattat P-J, Totty H, et al. 2018. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. C. Munoz-Zanzi, ed PLoS Negl Trop Dis 12:e0006874; <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006874>.
- Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. 1994. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 38:805–811; <https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.805>.

- Minero MV, Marín M, Cercenado E, Rabadán PM, Bouza E, Muñoz P. 2009. Nocardiosis at the Turn of the Century. *Medicine (Baltimore)* 88:250; <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181afa1c8>.
- Mirande C, Canard I, Buffet Croix Blanche S, Charrier J-P, van Belkum A, Welker M, *et al.* 2015. Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34:2225–2234; <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2473-z>.
- Mishra M, Arukha AP, Patel AK, Behera N, Mohanta TK, Yadav D. 2018. Multi-drug resistant coliform: water sanitary standards and health hazards. *Front Pharmacol* 9:311; <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00311>.
- Mishra SK. 1980. Identification of *Nocardiae* and *Streptomyces* of Medical Importance. *J Clin Microbiol* 11: 9.
- Moldowan JM, Seifert WK, Gallegos EJ. 1985. Relationship between petroleum composition and depositional environment of petroleum source rocks. *AAPG Bull* 69: 1255–1268.
- Moser BD, Klenk H-P, Schumann P, Pötter G, Lasker BA, Steigerwalt AG, *et al.* 2011. *Nocardia niwae* sp. nov., isolated from human pulmonary sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:438–442; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.020370-0>.
- Moshtaghi Nikou M, Ramezani M, Ali Amoozegar M, Rasooli M, Harirchi S, Shahzadeh Fazeli SA, *et al.* 2015. *Nocardia halotolerans* sp. nov., a halotolerant actinomycete isolated from saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:3148–3154; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000394>.
- Mrozek N, Hamizi S, Gourdon F, Laurichesse H, Beytout J, Lesens O. 2008. Nocardiose disséminée nosocomiale probable après chirurgie prothétique ostéoarticulaire chez un patient immunocompétent. *Rev Médecine Interne* 29:1034–1037; <http://doi.org/10.1016/j.revmed.2008.02.016>.

## N

- Nhi-Cong LT, Mikolasch A, Awe S, Sheikhan H, Klenk H-P, Schauer F. 2010. Oxidation of aliphatic, branched chain, and aromatic hydrocarbons by *Nocardia cyriacigeorgica* isolated from oil-polluted sand samples collected in the Saudi Arabian Desert. *J Basic Microbiol* 50:241–253; <http://doi.org/10.1002/jobm.200900358>.
- Nocard E. 1888. *Note sur la maladie des bœufs de la Guadeloupe connue sous le nom de farcin*. Annales de l'Institut Pasteur. Paris.
- Nouioui I, Carro L, Sangal V, Jando M, Igual JM, Goodfellow M, *et al.* 2018. Formal description of *Mycobacterium neglectum* sp. nov. and *Mycobacterium palauense* sp. nov., rapidly growing actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111:1209–1223; <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1029-5>.

## O

Ogata SA, Beaman BL. 1992. Adherence of *Nocardia asteroides* within the murine brain. *INFECT IMMUN* 60: 6.

Oren A, Garrity G. 2019. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol* 69:2627–2629; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003624>.

Ozdemir-Kocak F, Saygin H, Saricaoglu S, Cetin D, Pötter G, Spröer C, *et al.* 2016. *Nocardia zapadnayensis* sp. nov., isolated from soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109:95–103; <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0612-2>.

## P

Paige EK, Spelman D. 2019. Nocardiosis: 7-year experience at an Australian tertiary hospital. *Intern Med J* 49:373–379; <https://doi.org/10.1111/imj.14068>.

Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, *et al.* 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. C.-A.D. Burnham, ed *J Clin Microbiol* 53:1731–1735; <https://doi.org/10.1128/JCM.03094-14>.

Parker CT, Tindall BJ, Garrity GM. 2019. International code of nomenclature of Prokaryotes: Prokaryotic code (2008 revision). *Int J Syst Evol Microbiol* 69:S1–S111; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>.

Parnell MJ, Hubbard GB, Fletcher KC, Schmidt RE. 1983. *Nocardia asteroides* infection in a purple throated sunbird (*Nectarinia sperapa*). *Vet Pathol* 20:497–500; <https://doi.org/10.1177/030098588302000414>.

Paściak M, Dacko W, Sikora J, Gurlaga D, Pawlik K, Miękiński G, *et al.*, 2015. Creation of an in-house matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry *Corynebacterineae* database overcomes difficulties in identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates. G.A. Land, ed *J Clin Microbiol* 53:2611–2621; <http://doi.org/10.1128/JCM.00268-15>.

Piau C, Kerjouan M, Le Mouel M, Patrat-Delon S, Henaux P-L, Brun V, *et al.*, 2015. First case of disseminated infection with *Nocardia cerradoensis* in a human. G.V. Doern, ed *J Clin Microbiol* 53:1034–1037; <http://doi.org/10.1128/JCM.02979-14>.

Pitt R, Clark S, Field R. 1999. Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water* 20.

Pujic P, Beaman BL, Ravalison M, Boiron P, Rodríguez-Nava V. 2015. Chapter 40 - *Nocardia* and *Actinomyces*. In: *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* (Y.-W. Tang, M.

Sussman, D. Liu, I. Poxton, and J. Schwartzman, eds). Academic Press: Boston. 731–752.

## Q

Quadri LEN, Sello J, Keating TA, Weinreb PH, Walsh CT. 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* 5:631–645; [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90291-5](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90291-5).

Quatrini P, Scaglione G, Pasquale CD, Riela S, Puglia AM. 2008. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. *J Appl Microbiol* 104:251–259; <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03544.x>.

## R

Rahdar H, Azadi D, Shojaei H, Daei-Naser A. 2017. Molecular analysis and species diversity of *Nocardia* in the hospital environment in a developing country, a potential health hazard. *J Med Microbiol* 66:334–341.

Rahmati M, Weihermüller L, Vanderborght J, Pachepsky YA, Mao L, Sadeghi SH, *et al.*, 2018. Development and analysis of the Soil Water Infiltration Global database. *Earth Syst Sci Data* 10:1237–1263; <http://doi.org/10.5194/essd-10-1237-2018>.

Ramalingam V, Cupples AM. 2020. Enrichment of novel Actinomycetales and the detection of monooxygenases during aerobic 1,4-dioxane biodegradation with uncontaminated and contaminated inocula. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:2255–2269; <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10376-7>.

Rangseekaew P, Pathom-aree W. 2019. Cave *Actinobacteria* as producers of bioactive metabolites. *Front Microbiol* 10:387; <http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00387>.

Raynaud X, Nunan N. 2014. Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. F. Pappalardo, ed *PLoS ONE* 9:e87217; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087217>.

Restagno D, Venet F, Paquet C, Freyburger L, Allaouchiche B, Monneret G, *et al.*, 2016. Mice survival and plasmatic cytokine secretion in a “two hit” model of sepsis depend on intratracheal *Pseudomonas Aeruginosa* bacterial load. *PLoS One* 11:e0162109; <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0162109>.

Rodriguez GM, Smith I. 2006. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 188:424–430; <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.424-430.2006>.

Rodríguez-Nava V, Couble A, Molinard C, Sandoval H, Boiron P, Laurent F. 2004. *Nocardia mexicana* sp. nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. *J Clin Microbiol* 42:4530–4535; <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4530-4535.2004>.

- Rodriguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois J-P, Boiron P, Laurent F. 2006. Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* gene-based identification of *Nocardia* species. J Clin Microbiol 44:536–546; <http://doi.org/10.1128/JCM.44.2.536-546.2006>.
- Rodriguez-Nava V, Khan ZU, Potter G, Kroppenstedt RM, Boiron P, Laurent F. 2007. *Nocardia coubleae* sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. Int J Syst Evol Microbiol 57:1482–1486; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64815-0>.
- Rodriguez-Nava V, Zoropoguy A, Laurent F, Blaha D, Couble A, Mouniée D, et al. 2008. La nocardiose, une maladie en expansion. Antibiotiques 10:115–127; <https://doi.org/10.1016/j.antib.2008.06.002>.
- Rodriguez-Nava V, Couble A, Khan ZU, Perouse de Montclos M, Brasme L, Villuendas C, et al., 2005. *Nocardia ignorata*, a new agent of human nocardiosis isolated from respiratory specimens in Europe and soil samples from Kuwait. J Clin Microbiol 43:6167–6170; <http://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6167-6170.2005>.
- Rodriguez-Nava V, Durupt S, Chyderiotis S, Freydière A-M, Karsenty J, de Montclos M, et al. 2015. A French multicentric study and review of pulmonary *Nocardia* spp. in cystic fibrosis patients. Med Microbiol Immunol (Berl) 204:493–504; <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0360-3>.
- Rodriguez-Nava V, Khan ZU, Potter G, Kroppenstedt RM, Boiron P, Laurent F. 2007. *Nocardia coubleae* sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. Int J Syst Evol Microbiol 57:1482–1486; <http://doi.org/10.1099/ijs.0.64815-0>.
- Rodriguez-Nava V, Lebeaux D, Lortholary O, Boiron P. 2019. *Nocardia* et Nocardiose. In: J. Freney, F. Renaud, R. Leclercq, P. Riegel (Eds), *Précis de bactériologie clinique*, 3<sup>ème</sup> éd. Editions ESKA. 809–827.
- Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H. 2003. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. J Clin Microbiol 41:851–856; <http://doi.org/10.1128/JCM.41.2.851-856.2003>.
- Roy A, Sar P, Sarkar J, Dutta A, Sarkar P, Gupta A, et al. 2018. Petroleum hydrocarbon rich oil refinery sludge of North-East India harbours anaerobic, fermentative, sulfate-reducing, syntrophic and methanogenic microbial populations. BMC Microbiol 18:151; <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1275-8>.
- Rudramurthy SM, Kaur H, Samanta P, Ghosh A, Chakrabarti A, Honnavar P, et al., 2015. Molecular identification of clinical *Nocardia* isolates from India. J Med Microbiol 64:1216–1225; <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000143>.
- Ruimy R, Riegel P, Carlotti A, Boiron P, Bernardin G, Monteil H, et al. 1996. *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. nov., a new species of *Nocardia* which groups bacterial strains

previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive diseases. Int J Syst Bacteriol 46:259–264; <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-259>.

## S

Saintpierre-Bonaccio D, Maldonado LA, Amir H, Pineau R, Goodfellow M. 2004. *Nocardia neocaledoniensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil. Int J Syst Evol Microbiol 54:599–603; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02881-0>.

Saito S, Nishimura T, Kamata H, Takamatsu D, Sato M. 2009. Bovine stillbirth due to *Nocardia farcinica*. J Vet Med Sci 71:1665–1668; <https://doi.org/10.1292/jvms.001665>.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol; <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.

Sakakibara I, Sugimoto Y, Minato H, Takasaka M, Honjo S. 1984. Spontaneous nocardiosis with brain abscess caused by *Nocardia asteroides* in a cynomolgus monkey. J Med Primatol 13: 89–95.

Salinas-Carmona MC. 2000. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. Microbes Infect 2:1373–1381; [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01291-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01291-0).

Sánchez-Herrera K, Sandoval H, Mounié D, Ramírez-Durán N, Bergeron E, Boiron P, et al., 2017. Molecular identification of *Nocardia* species using the *sodA* gene: Identificación molecular de especies de *Nocardia* utilizando el gen *sodA*. New Microbes New Infect 19:96–116; <http://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.03.008>.

Saracli MA, Fothergill AW, Sutton DA, Wiederhold NP. 2015. Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Med Mycol 53:736–742; <https://doi.org/10.1093/mmy/myv046>.

Sato Y, Mochizuki A. 1986. A case of canine systemic nocardiosis. Nihon Juigaku Zasshi Jpn J Vet Sci 48:629–632; <https://doi.org/10.1292/jvms1939.48.629>.

Saubolle MA. 1993. *In vitro* susceptibility testing of clinical isolates of *Nocardia*. Clin Microbiol Newsl 15:169–172; [http://doi.org/10.1016/0196-4399\(93\)90044-N](http://doi.org/10.1016/0196-4399(93)90044-N).

Saulais M, Bedell JP, Delolme C. 2011. Cd, Cu and Zn mobility in contaminated sediments from an infiltration basin colonized by wild plants: The case of *Phalaris arundinacea* and *Typha latifolia*. Water Sci Technol 64:255–262; <https://doi.org/10.2166/wst.2011.161>.

Sazak A, Sahin N, Camas M. 2012. *Nocardia goodfellowii* sp. nov. and *Nocardia thraciensis* sp. nov., isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol 62:1228–1234; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.031559-0>.



- Schildkraut CL, Marmur J, Doty P. 1961. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. *J Mol Biol* 3:595–617; [http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80024-7](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80024-7).
- Schlaberg R, Fisher MA, Hanson KE. 2014. Susceptibility profiles of *Nocardia* isolates based on current taxonomy. *Antimicrob Agents Chemother* 58:795–800; <https://doi.org/10.1128/AAC.01531-13>.
- Schlaberg R, Huard RC, Della-Latta P. 2008. *Nocardia cyriacigeorgica*, an emerging pathogen in the United States. *J Clin Microbiol* 46:265–273; <http://doi.org/10.1128/JCM.00937-07>.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, *et al.* 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541; <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- Schroeder EK, de Souza ON, Santos DS, Blanchard JS, Basso LA. 2002. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotechnol* 3:197–225; <https://doi.org/10.2174/1389201023378328>.
- Sébastien C, Barraud S, Ribun S, Zoropogui A, Blaha D, Becouze-Lareure C, *et al.*, 2014. Accumulated sediments in a detention basin: chemical and microbial hazard assessment linked to hydrological processes. *Environ Sci Pollut Res* 21:5367–5378; <http://doi.org/10.1007/s11356-013-2397-z>.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P, Rolain JM, *et al.* 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49:543–551; <https://doi.org/10.1086/600885>.
- Seo JP, Lee SD. 2006. *Nocardia harenae* sp. nov., an actinomycete isolated from beach sand. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2203–2207; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64187-0>.
- Seo JP, Yun Y-W, Lee SD. 2007. *Nocardia speluncae* sp. nov., isolated from a cave. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2932–2935; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65085-0>.
- Shivlata L, Tulasi S. 2015. Thermophilic and alkaliphilic *Actinobacteria*: biology and potential applications. *Front Microbiol* 6:1014; <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01014>.
- Singh P, Katoch VM, Mohanty KK, Chauhan DS. 2016. Analysis of expression profile of mce operon genes (mce1, mce2, mce3 operon) in different *Mycobacterium tuberculosis* isolates at different growth phases. *Indian J Med Res* 143:487–494; <https://doi.org/10.4103/0971-5916.184305>.
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Evol Microbiol* 30:225–420; <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>.



- Soddell JA, Seviour RJ. 1990. Microbiology of foaming in activated sludge plants. *J Appl Bacteriol* 69:145–176; <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01506.x>.
- Stackebrandt E, Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 33:152–155.
- Sun L, Chen J, Wei X, Guo W, Lin M, Yu X. 2016. Study of the diversity of microbial communities in a sequencing batch reactor oxic–settling–anaerobic process and its modified process. *Can J Microbiol* 62:411–421; <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0194>.
- Sun W, Zhang Y-Q, Huang Y, Zhang Y-Q, Yang Z-Y, Liu Z-H. 2009. *Nocardia jinanensis* sp. nov., an amicoumacin B-producing actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:417–420; <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.002899-0>.
- Sykes G, Skinner FA. *Actinomycetales characteristics and practical importance*. Academic Press. London.

## T

- Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gono T, Mikami Y. 2010. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *J Med Microbiol* 59:165–171; <https://doi.org/10.1099/jmm.0.011346-0>.
- Tam S, Maksaerekul S, Hyde DM, Godinez I, Beaman BL. 2012. IL-17 and  $\gamma\delta$  T-lymphocytes play a critical role in innate immunity against *Nocardia asteroides* GUH-2. *Microbes Infect* 14:1133–1143; <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.008>.
- Tamura T, Ohji S, Ichikawa N, Hosoyama A, Yamazoe A, Hamada M, *et al.*, 2018. Reclassification of *Nocardia* species based on whole genome sequence and associated phenotypic data. *J Antibiot (Tokyo)* 71:633–641; <http://doi.org/10.1038/s41429-018-0043-1>.
- Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. 2012. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol* 50:3301–3308; <https://doi.org/10.1128/JCM.01405-12>.
- Tanasupawat S, Phongsopitanun W, Suwanborirux K, Ohkuma M, Kudo T. 2016. *Nocardia rayongensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1950–1955; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000971>.
- Tancsics A, Benedek T, Farkas M, Mathe I, Marialigeti K, Szoboszlay S, *et al.* 2014. Sequence analysis of 16S rRNA, *gyrB* and *catA* genes and DNA-DNA hybridization reveal that *Rhodococcus jialingiae* is a later synonym of *Rhodococcus qingshengii*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:298–301; <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.059097-0>.

- Tao W, Yang A, Deng Z, Sun Y. 2018. CRISPR/Cas9-based editing of *Streptomyces* for discovery, characterization, and production of natural products. *Front Microbiol* 9:1660; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01660>.
- Thawai C, Rungjindamai N, Klanbut K, Tanasupawat S. 2017. *Nocardia xestospongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1451–1456; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001736>.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. 1993. Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31:175–178.
- Trastoy R, Manso T, García X, Barbeito G, Navarro D, Rascado P, *et al.*, 2017. Coinfección pulmonar por *Nocardia cyriacigeorgica* y *Aspergillus fumigatus*. *Rev Esp Quimioter* 30:123–126.
- Tremblay J, Thibert L, Alarie I, Valiquette L, Pépin J. 2011. Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988–2008. *Clin Microbiol Infect* 17:690–696; <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03306.x>.

## U

- Uhde A-K, Kilwinski J, Peters M, Verspohl J, Feßler AT, Schwarz S, *et al.*, 2016. Fatal nocardiosis in a dog caused by multiresistant *Nocardia veterana*. *Vet Microbiol* 183:78–84; <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.001>.

## V

- Vaddavalli R, Peddi S, Kothagauni SY, Linga VR. 2014. *Nocardia bhagyanesis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the rhizosphere of *Callistemon citrinus* (Curtis), India. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105:443–450; <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0093-0>.
- Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Navarro AM, *et al.*, 2016. Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain. *J Antimicrob Chemother* dkw489; <http://doi.org/10.1093/jac/dkw489>.
- Vautrin F, Bergeron E, Dubost A, Abrouk D, Martin C, Cournoyer B, *et al.* 2019. Genome sequences of three *Nocardia cyriacigeorgica* strains and one *Nocardia asteroides* strain. I.L.G. Newton, ed *Microbiol Resour Announc* 8:e00600-19, /mra/8/33/MRA.00600-19.atom; <https://doi.org/10.1128/MRA.00600-19>.
- Vemireddi V, Sharma A, Wu CC, Lin TL. 2007. Systemic Nocardiosis in a reindeer (*Rangifer Tarandus Tarandus*). *J Vet Diagn Invest* 19:326–329; <https://doi.org/10.1177/104063870701900320>.

- Vera-Cabrera L, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Perez-Maya AA, Ocampo-Candiani J. 2012. Complete genome sequence of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. J Bacteriol 194:2761–2762; <http://doi.org/10.1128/JB.00210-12>.
- Verma R, Walia R, Sondike SB, Khan R. 2016. Pulmonary nocardiosis in an adolescent patient with Crohn's disease treated with infliximab: a serious complication of TNF-alpha blockers. W V Med J 111:36–39
- Vermeulen I, Baird M, Al-Dulayymi J, Smet M, Verschoor J, Grooten J. 2017. Mycolates of *Mycobacterium tuberculosis* modulate the flow of cholesterol for bacillary proliferation in murine macrophages. J Lipid Res 58:709–718; <https://doi.org/10.1194/jlr.M073171>.
- Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T-D, Wauters G, et al. 2010. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. J Clin Microbiol 48:4015–4021; <https://doi.org/10.1128/JCM.01234-10>.
- Vezzaro L, Mikkelsen PS. 2012. Application of global sensitivity analysis and uncertainty quantification in dynamic modelling of micropollutants in stormwater runoff. Environ Model Softw 27–28:40–51; <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2011.09.012>.
- Voisin J. 2017. Influence des pratiques de recharge des aquifères par des eaux pluviales sur les communautés microbiennes des nappes phréatiques. Thèse, Lyon.
- Voisin J, Cournoyer B, Vienney A, Mermillod-Blondin F. 2018. Aquifer recharge with stormwater runoff in urban areas: Influence of vadose zone thickness on nutrient and bacterial transfers from the surface of infiltration basins to groundwater. Sci Total Environ 637–638:1496–1507; <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.094>.
- Vuotto F, Faure K, Queyre V, Dessein R, Pasquet A, Lambert M, et al., 2011. Vascular nosocomial *Nocardia farcinica* infection after arterial stenting in an immunocompetent patient. Can J Infect Dis Med Microbiol 22:e10–e11; <http://doi.org/10.1155/2011/216873>.

## W

- Wallace RJ, Steele LC, Sumter G, Smith JM. 1988. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. Antimicrob Agents Chemother 32:1776–1779; <http://doi.org/10.1128/AAC.32.12.1776>.
- Wang L, Zhang Y, Lu Z, Shi Y, Liu Z, Maldonado L, et al. 2001. *Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil. Int J Syst Evol Microbiol 51:1783–1788; <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1783>.
- Wang L, Zhang Y, Huang Y, Maldonado LA, Liu Z, Goodfellow M. 2004. *Nocardia pigrifrangens* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a contaminated agar plate. Int J Syst Evol Microbiol 54:1683–1686; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03035-0>.

- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267; <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- Wang H-L, Seo Y-H, LaSala PR, Tarrand JJ, Han XY. 2014. Nocardiosis in 132 patients with cancer. *Am J Clin Pathol* 142:513–523; <https://doi.org/10.1309/AJCPW84AFTUWMHYU>.
- Wang Y, Liu W, Feng W-W, Zhou X-Q, Bai J-L, Yuan B, *et al.* 2015. *Nocardia rhizosphaerae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the coastal rhizosphere of *Artemisia Linn.*, China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 108:31–39; <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0460-0>.
- Wang Q, Hou J, Yuan J, Wu Y, Liu W, Luo Y, *et al.* 2020. Evaluation of fatty acid derivatives in the remediation of aged PAH-contaminated soil and microbial community and degradation gene response. *Chemosphere* 248:125983; <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125983>.
- Warawa JM, Long D, Rosenke R, Gardner D, Gherardini FC. 2009. Role for the *Burkholderia pseudomallei* capsular polysaccharide encoded by the wcb operon in acute disseminated melioidosis. *Infect Immun* 77:5252–5261; <https://doi.org/10.1128/IAI.00824-09>.
- Watanabe K, Shinagawa M, Amishima M, Iida S, Yazawa K, Kageyama A, *et al.* 2006. First clinical isolates of *Nocardia carnea*, *Nocardia elegans*, *Nocardia paucivorans*, *Nocardia puris* and *Nocardia takedensis* in Japan. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 47:85–89; <https://doi.org/10.3314/jjmm.47.85>.
- Wayne LG. 1987. International committee on systematic bacteriology. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. 37: 463–464.
- Widdel F, Rabus R. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 12:259–276; [http://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00209-3](http://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00209-3).
- Wilson JW. 2012. Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo Clin Proc* 87:403–407; <http://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.11.016>.
- Winiarski T, Bedell J-P, Delolme C, Perrodin Y. 2006. The impact of stormwater on a soil profile in an infiltration basin. *Hydrogeol J* 14:1244–1251; <https://doi.org/10.1007/s10040-006-0073-9>.
- Winiarski T, Lassabatere L, Angulo-Jaramillo R, Goutaland D. 2013. Characterization of the heterogeneous flow and pollutant transfer in the unsaturated zone in the fluvio-glacial deposit. *Procedia Environ Sci* 19:955–964; <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2013.06.105>.
- Winiarski T. 2014. Fonction filtration d'un ouvrage urbain - conséquence sur la formation d'un anthroposol. 199 p.

Witebsky FG, Conville PS, Wallace RJ, Brown-Elliott BA, Huard RC, Schlaberg R, et al. 2008. *Nocardia cyriacigeorgica* - an established rather than an emerging pathogen. J Clin Microbiol 46:2469–2470; <https://doi.org/10.1128/JCM.00510-08>.

## X

Xiao M, Pang L, Chen SC-A, Fan X, Zhang L, Li H-X, et al., 2016. Accurate identification of common pathogenic *Nocardia* species: evaluation of a multilocus sequence analysis platform and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. P.C. Woo, ed PLOS ONE 11:e0147487; <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0147487>.

Xing K, Qin S, Fei S-M, Lin Q, Bian G-K, Miao Q, et al. 2011. *Nocardia endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the oil-seed plant *Jatropha curcas* L. Int J Syst Evol Microbiol 61:1854–1858; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.027391-0>.

Xu P, Li W-J, Tang S-K, Jiang Y, Chen H-H, Xu L-H, et al. 2005. *Nocardia polyresistens* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 55:1465–1470; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63352-0>.

Xu P, Li W-J, Tang S-K, Jiang Y, Gao H-Y, Xu L-H, et al. 2006. *Nocardia lijiangensis* sp. nov., a novel actinomycete strain isolated from soil in China. Syst Appl Microbiol 29:308–314; <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.11.009>.

Xue Y. 2003. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading *Actinomycete* isolated from an oil-producing well. Int J Syst Evol Microbiol 53:1643–1646; <http://doi.org/10.1099/ijs.0.02605-0>.

## Y

Yamamura H, Hayakawa M, Nakagawa Y, Tamura T, Kohno T, Komatsu F, et al. 2005. *Nocardia takedensis* sp. nov., isolated from moat sediment and scumming activated sludge. Int J Syst Evol Microbiol 55:433–436; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63189-0>.

Yamamura H, Tamura T, Sakiyama Y, Harayama S. 2007. *Nocardia amamiensis* sp. nov., isolated from a sugar-cane field in Japan. Int J Syst Evol Microbiol 57:1599–1602; <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64829-0>.

Yang R-Q, Zhang B-L, Sun H-L, Zhang G-S, Li S-W, Liu G-X, et al. 2019. *Nocardia mangyaensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from crude-oil-contaminated soil. Int J Syst Evol Microbiol 69:397–403; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003159>.

Yang Y, Xu C, Cao X, Lin H, Wang J. 2017. Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. Ecotoxicology 26:831–840; <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1814-3>. Yassin AF, Rainey FA, Mendrock U, Brzezinka H, Schaal KP. 2000a. *Nocardia abscessus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 50:1487–1493; <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1487>.

- Yassin AF, Rainey FA, Burghardt J, Brzezinka H, Mauch M, Schaal KP. 2000b. *Nocardia paucivorans* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 50 Pt 2:803–809; <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-803>.
- Yassin AF, Rainey FA, Steiner U. 2001a. *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov.. Int J Syst Evol Microbiol 51:1419–1423; <http://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1419>.
- Yassin AF, Rainey FA, Steiner U. 2001b. *Nocardia ignorata* sp. nov.. Int J Syst Evol Microbiol 51:2127–2131; <http://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2127>.
- Yassin AF. 2003. *Nocardia puris* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53:1595–1599; <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02593-0>.
- Yassin AF, Brenner S. 2005. *Nocardia elegans* sp. nov., a member of the *Nocardia vaccinii* clade isolated from sputum. Int J Syst Evol Microbiol 55:1505–1509; <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63570-0>.
- Yun C-S, Hasegawa H, Nanamiya H, Terakawa T, Tozawa Y. 2009. Novel bacterial N-acetyltransferase gene for herbicide detoxification in land plants and selection marker in plant transformation. Biosci Biotechnol Biochem 73:1000–1006; <https://doi.org/10.1271/bbb.80777>.

## Z

- Zeinali M, Vossoughi M, Ardestani SK. 2008. Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. Chemosphere 72:905–909; <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.038>.
- Zhang F, Xie J-P. 2011. Mammalian cell entry gene family of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell Biochem 352:1–10; <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0733-5>.
- Zhang J-X. 2003. *Nocardia caishijiensis* sp. nov., a novel soil actinomycete. Int J Syst Evol Microbiol 53:999–1004; <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02397-0>.
- Zhang J-X, Liu Z, Goodfellow M. 2004. *Nocardia xishanensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol 54:2301–2305; <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63133-0>.
- Zhang J-X, Ming H, Zhao Z-L, Ji W-L, Chang X-L, Zhang L-Y, et al. 2019. *Nocardia yunnanensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a soil sample. Int J Syst Evol Microbiol; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003600>.
- Zhao G-Z, Li J, Zhu W-Y, Klenk H-P, Xu L-H, Li W-J. 2011. *Nocardia artemisiae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized stem of *Artemisia annua* L. Int J Syst Evol Microbiol 61:2933–2937; <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.029306-0>.

- Zhao J, Han X, Hu H, Ling L, Zhang X, Guo X, *et al.* 2019. *Nocardia stercoris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the cow dung. *Int J Syst Evol Microbiol*; <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003784>.
- Zhou ZD, Tan E-K. 2017. Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* 12:75; <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0218-4>.
- Zolg JW, Philippi-Schulz S. 1994. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of *Mycobacteria* by PCR. *J Clin Microbiol* 32:12.
- Zoropogui A, Pujic P, Normand P, Barbe V, Beaman B, Beaman L, *et al.*, 2012. Genome sequence of the human- and animal-pathogenic strain *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2. *J Bacteriol* 194:2098–2099; <http://doi.org/10.1128/JB.00161-12>.
- Zoropogui A, Pujic P, Normand P, Barbe V, Belli P, Graindorge A, *et al.*, 2013. The *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2 genome shows ongoing adaptation of an environmental *Actinobacteria* to a pathogen's lifestyle. *BMC Genomics* 14:286; <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-286>.





**VAUTRIN Florian**

**Milieu urbain et exposition aux Actinobactéries pathogènes ; cas particulier des bassins d'infiltration**

**Résumé**

En ville, les eaux pluviales peuvent être collectées et dirigées vers des bassins d'infiltration. Elles se chargent, lors du ruissellement et du lessivage des sols et des toitures, en polluants divers : hydrocarbures, métaux lourds, polluants organiques persistants, médicaments, pesticides. Ces contaminants sont transportés essentiellement sous formes particulaires. Celles-ci s'accumulent à la surface des bassins d'infiltration et forment une couche de sédiments urbains riches en polluants qui représentent une nouvelle niche écologique pour des bactéries pathogènes opportunistes. On retrouve des Actinobactéries pathogènes dont *Nocardia cyriacigeorgica*. Pour l'heure, les études réalisées sur cette espèce en terme de physiopathologie l'ont été uniquement sur des souches cliniques et ne prennent pas compte les isolats environnementaux. Les principaux objectifs de ces travaux de thèse étaient d'évaluer la biodiversité spatio-temporelle des Actinobactéries présentes dans les sédiments d'un bassin d'infiltration avec un focus sur les espèces pathogènes du genre *Nocardia*, mais également d'établir des liens phylogénétiques entre des souches isolées d'un environnement urbain et des souches provenant de patients français atteints de nocardiose, et ainsi déterminer la dangerosité de ces clones environnementaux. Trois campagnes d'échantillonnage ont été réalisées dans un bassin d'infiltration de l'Est lyonnais (Django-Reinhardt) au printemps, en été et en automne. La biodiversité des communautés d'Actinobactéries a été décrite pour la première fois par méthode de séquençage nouvelle génération à l'aide du marqueur *hsp65*. La diversité infraspécifique des isolats environnementaux de *N. cyriacigeorgica* provenant du bassin d'infiltration et de souches cliniques fournies par l'Observatoire Français des Nocardioses a été quantifiée par une analyse multiloci (*rrs-hsp65-sodA-secA1*). La virulence des deux souches modèles urbaine EML446 et clinique GUH-2 de *N. cyriacigeorgica* a été évaluée par génomique comparative en étudiant le contenu en gènes de virulence des deux génomes, puis par expérimentation animale sur modèle murin d'immunoparalysie transitoire CLP 30 %. Les résultats de ce travail mettent en évidence la variabilité de la diversité spatio-temporelle des espèces pathogènes et indigènes d'Actinobactéries dominées par environ 80 % de bactéries du genre *Mycobacterium* mais également de *Nocardia* dans les sédiments du bassin d'infiltration Django-Reinhardt. Le mercure, le cuivre et une forte humidité semblent favoriser le développement des espèces pathogènes. La souche urbaine EML446, n'appartenant pas au phylogroupe contenant la souche hautement pathogène GUH-2, présente tout de même un fort pouvoir pathogène sur modèle murin d'immunoparalysie transitoire à une dose de  $1,0 \times 10^6$  UFC/souris ainsi que des contenus en gènes de virulence semblables. En conclusion, cette thèse a mis en évidence un risque microbiologique lié à la présence de l'espèce pathogène *N. cyriacigeorgica* dans un environnement urbain pollué en lien avec la gestion des eaux pluviales. Elle ouvre ainsi des perspectives sur la réorganisation taxonomique de *N. cyriacigeorgica* et une potentielle scission en trois espèces distinctes, pouvant avoir un impact en terme de virulence ou d'antibiorésistance, mais également sur l'utilisation de nouveaux outils permettant l'identification fine aussi bien clinique que dans l'environnement d'isolats ou de communautés bactériennes de *Nocardia* par métabarcoding à l'aide du marqueur *hsp65* et par MALDI-ToF MS.

**Mots clés** : Bactéries pathogènes opportunistes ; Bassin d'infiltration ; Biodiversité ; Diversité infraspécifique ; Ecologie microbienne ; Hydrologie urbaine ; Métabarcoding *hsp65* ; Modèle murin d'immunoparalysie ; *Nocardia cyriacigeorgica* ; Pollution urbaine ; Virulence.

**Discipline** : Ecologie Microbienne

**Directrice de thèse** : Pr. V. RODRIGUEZ-NAVA

**Co-directeur de thèse** : Dr. T. WINIARSKI

**Laboratoires** : UMR CNRS 5557, INRA 1418, VetAgro Sup - Laboratoire d'Ecologie Microbienne-Groupe de Recherches Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement, Université Claude Bernard Lyon 1

UMR CNRS 5023, ENTPE – Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Groupe de Recherche Impact des Polluants sur l'Environnement, Université Claude Bernard Lyon 1.

