



HAL
open science

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

Florian Vautrin

► **To cite this version:**

Florian Vautrin. Milieus 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, Benoit 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. Epidémiologie	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
PYLOGENIE PHYSIOPATHOLOGIE DE SOUCHES URBAINES DE <i>NOCARDIA</i>		
<i>CYRIACIGEORGICA</i>.....		
	<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		
	<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 ₂ M ₂	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, c'est-à-dire</i>
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
<i>m/z</i>	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 _m	(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 μm) alors qu'ils atteignent 3 μm 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 microorganismes acido-alcoolorésistants.

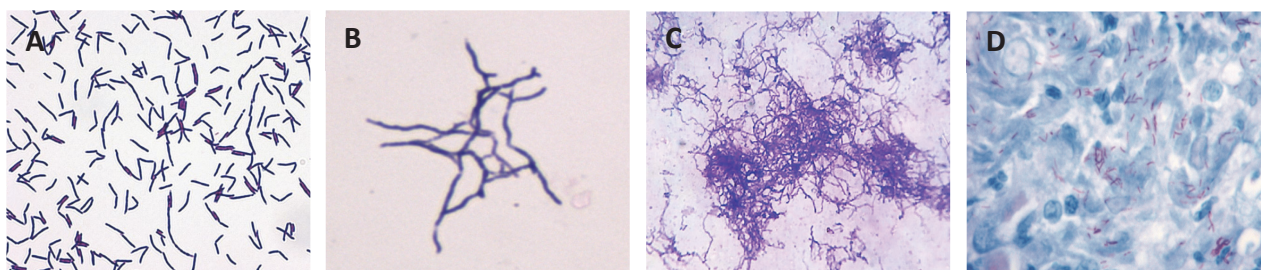


Figure 1.1. Observations microscopiques de *Gordonia* spp. (A), *Nocardia cyriacigeorgica* (B) et *Streptomyces griseus* (C) après une coloration de Gram et *Mycobacterium avium* (D) après une coloration de Ziehl-Neelsen.

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.

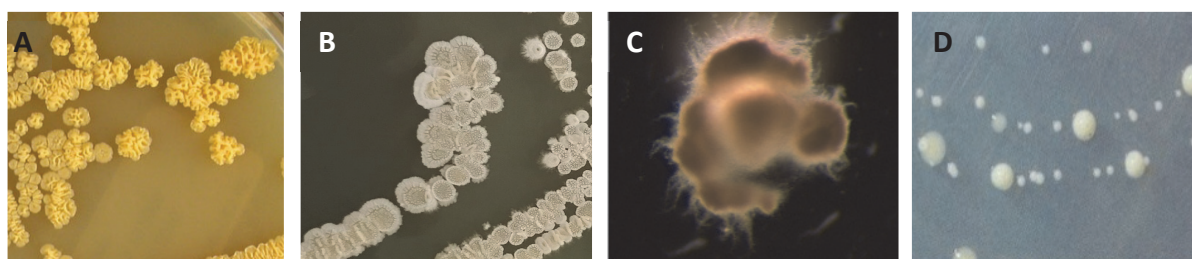


Figure 1.2. Observations macroscopiques de *Gordonia polyisoprenivorans* sur milieu BHI (A), *Nocardia cyriacigeorgica* sur milieu Bennett (B), *Streptomyces griseus* sur milieu NMMP modifié (C) et *Mycobacterium avium* sur milieu milieu Löwenstein-Jensen (D).

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**).

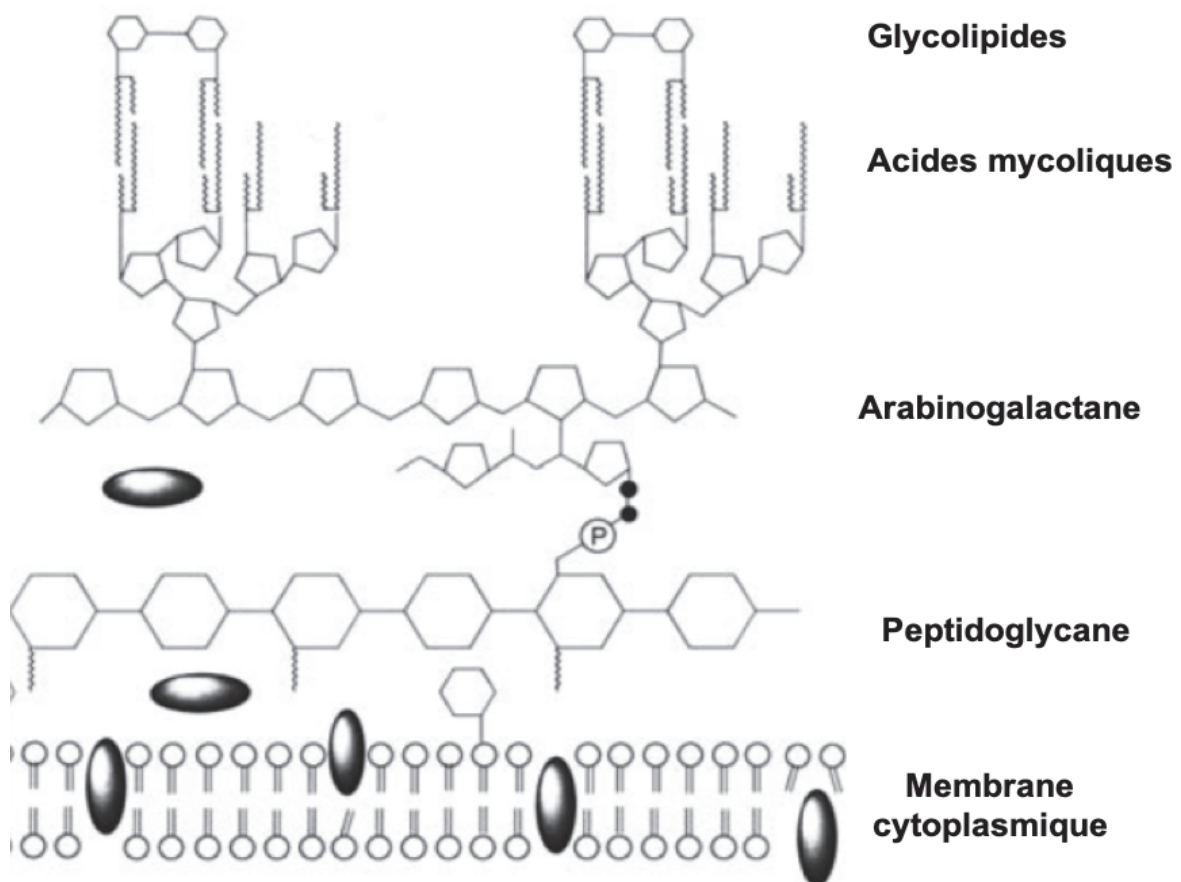


Figure 1.3. Schéma de la structure de la paroi des Actinobactéries (d'après Schroeder *et al.*, 2002).

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>Tsakamurella</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>Tsakamurella</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 ΔT_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).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Classe n = 6	Ordre n=29	Famille n = 64	
<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Acidimicrobiaceae</i>	
		<i>Iamiaeceae</i>	
		<i>Ilumatobacteraceae</i>	
		<i>Microthrixaceae</i>	
		<i>Acidothermales</i>	<i>Acidothermaceae</i>
		<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
		<i>Actinopolysporales</i>	<i>Actinopolysporaceae</i>
			<i>Mzabimycetaceae</i>
		<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
		<i>Catenulisporales</i>	<i>Actinospicaceae</i>
			<i>Catenulisporaceae</i>
		<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>
			<i>Dietziaceae</i>
			<i>Gordoniaceae</i>
			<i>Mycobacteriaceae</i>
	<i>Nocardiaee</i>		
	<i>Segniliparaceae</i>		
	<i>Tsukamurellaceae</i>		
	<i>Williamsiaceae</i>		
	<i>Frankiales</i>	<i>Cryptosporangiaceae</i>	
		<i>Frankiaceae</i>	
		<i>Motilbacteraceae</i>	
		<i>Sporichthyaceae</i>	
	<i>Geodermatophilales</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	
	<i>Glycomycetales</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	
	<i>Jiangellales</i>	<i>Jiangellaceae</i>	
	<i>Kineosporilaes</i>	<i>Kineosporaceae</i>	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Beutenbergiaceae</i>	
		<i>Bogoriellaceae</i>	
		<i>Cellulomonadaceae</i>	
		<i>Demequinaceae</i>	
		<i>Dermabacteraceae</i>	
		<i>Dermacoccaceae</i>	
		<i>Dermatophilaceae</i>	
		<i>Intrasporangiaceae</i>	
		<i>Jonesiaceae</i>	
		<i>Microbacteriaceae</i>	
		<i>Micrococcaceae</i>	
		<i>Promicromonosporaceae</i>	
		<i>Rarobacteraceae</i>	
	<i>Runiaceae</i>		
	<i>Sanguibacteraceae</i>		
	<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	
	<i>Nakamurellales</i>	<i>Nakamurellaceae</i>	
	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Nocardiodaceae</i>	
		<i>Propionibacteriaceae</i>	
	<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	
	<i>Streptomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	
	<i>Streptosporangiales</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>	
		<i>Streptosporangiaceae</i>	
		<i>Thermomonosporaceae</i>	
<i>Coriobacteriia</i>	<i>Coriobacteriales</i>	<i>Atopobiaceae</i>	
		<i>Coriobacteriaceae</i>	
	<i>Eggerthellales</i>	<i>Eggerthellaceae</i>	
	<i>Egibacterales</i>	<i>Egibacteraceae</i>	
<i>Niriliruptoria</i>	<i>Egicoccales</i>	<i>Egiccoccaceae</i>	
	<i>Euzebyales</i>	<i>Euzebyaceae</i>	
	<i>Nitiriliruptorales</i>	<i>Nitiriliruptoraceae</i>	
<i>Rubrobacteria</i>	<i>Gaiellales</i>	<i>Gaiellaceae</i>	
	<i>Rubrobacterales</i>	<i>Rubrobacteraceae</i>	
<i>Thermophilia</i>	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Conexibacteraceae</i>	
		<i>Parviterribacteraceae</i>	
		<i>Solirubrobacteraceae</i>	
	<i>Thermophilales</i>	<i>Thermophilaceae</i>	

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/wwtax.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 superoxide 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^{ème} 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 (puisqu'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.

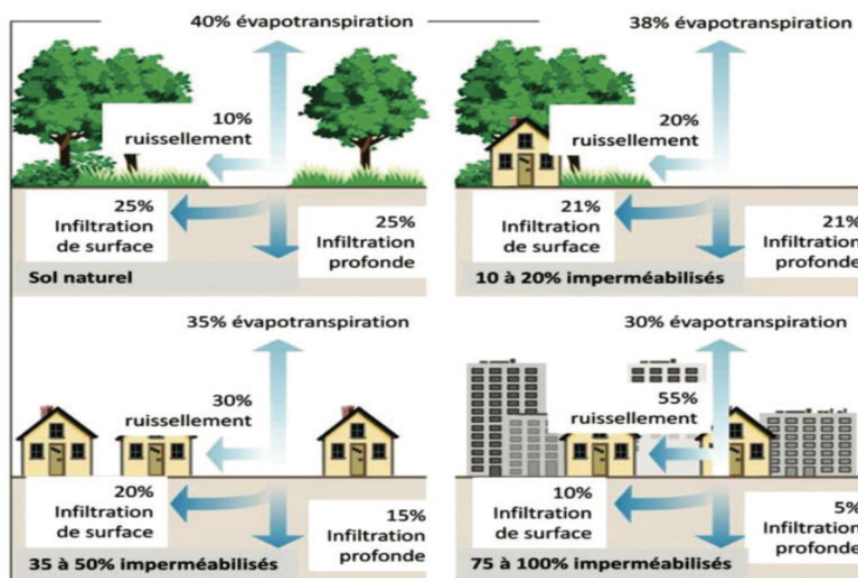


Figure 2.1. Relations entre l'imperméabilisation des sols et les différents modes d'évacuation des eaux pluviales. (D'après le site <http://graie.org/eaumelimelo/>)

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 conglomérat 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](#)).



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 sédimer les plus grosses particules

contenues dans l'eau (taille supérieure à 200 μm). 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).

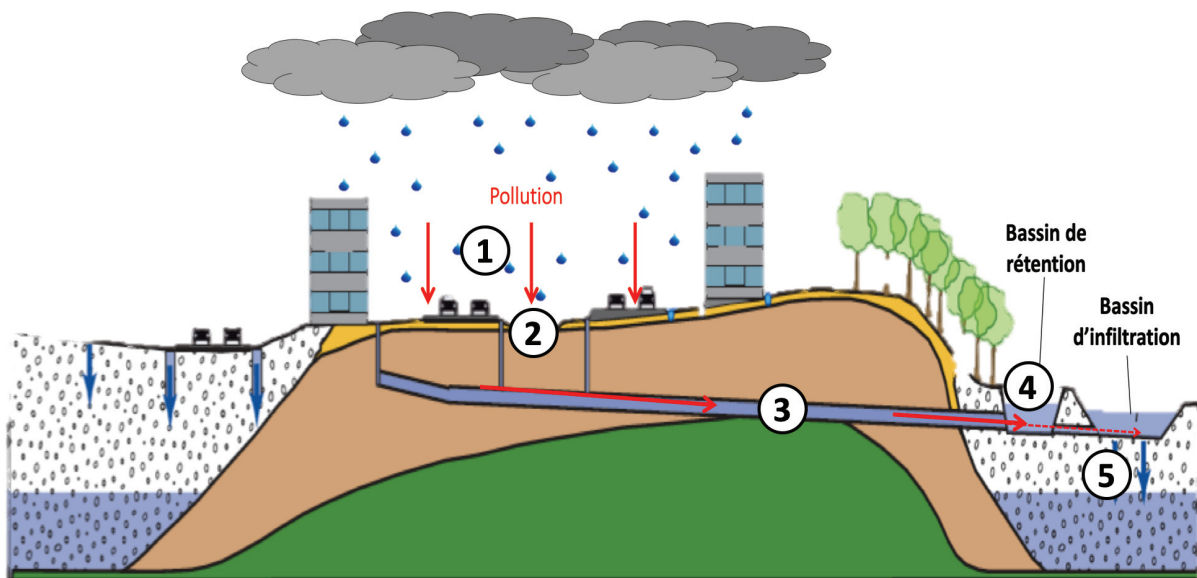


Figure 2.3. Gestion des eaux pluviales à Lyon (Schéma adapté du rapport Gessol (Winiarski *et al.*, 2015))

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'eau 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 fluvioglaciales 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).

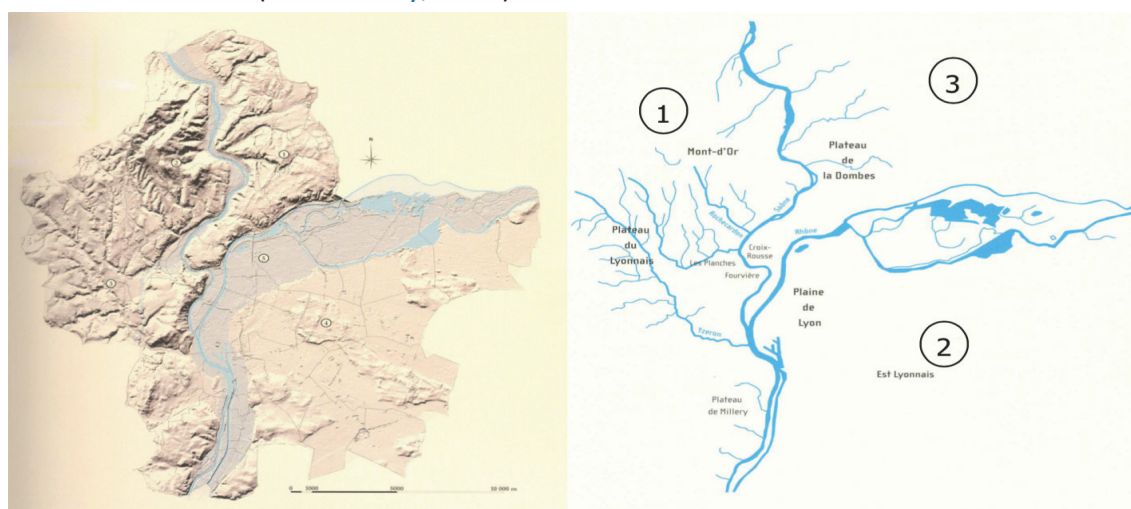


Figure 2.4. Topographie et hydrologie de la région lyonnaise (D'après « Les ressources en eau de la région lyonnaise » de Robert Jonac)

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.

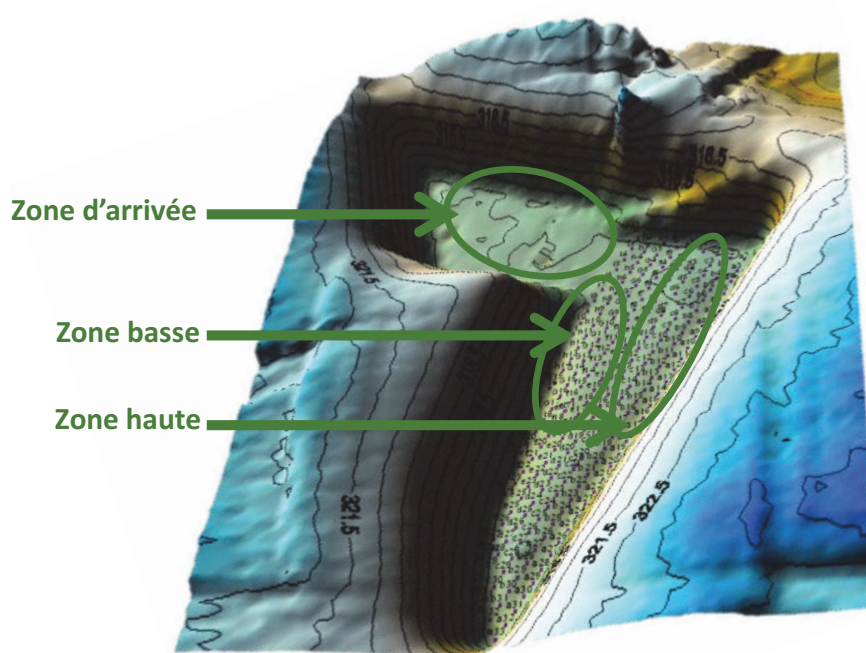


Figure 2.5. Bassin versant recueillant les eaux pluviales collectées par le bassin de rétention/infiltration Django-Reinhardt et topographie du bassin d'infiltration

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 km², comprend trois corridors constitués d'alluvions fluvioglaciaires très perméables (10⁻² à 10⁻³ m.s⁻¹) qui sont séparés par des buttes morainiques à faible perméabilité (10⁻⁵ à 10⁻⁸ m.s⁻¹). 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 m³ contre 61.000 m³ 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'infiltreraient 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'infiltrer 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). A 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*, alpiste 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 crépue). 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 félidés (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 (huitres 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**).

Milieux de culture

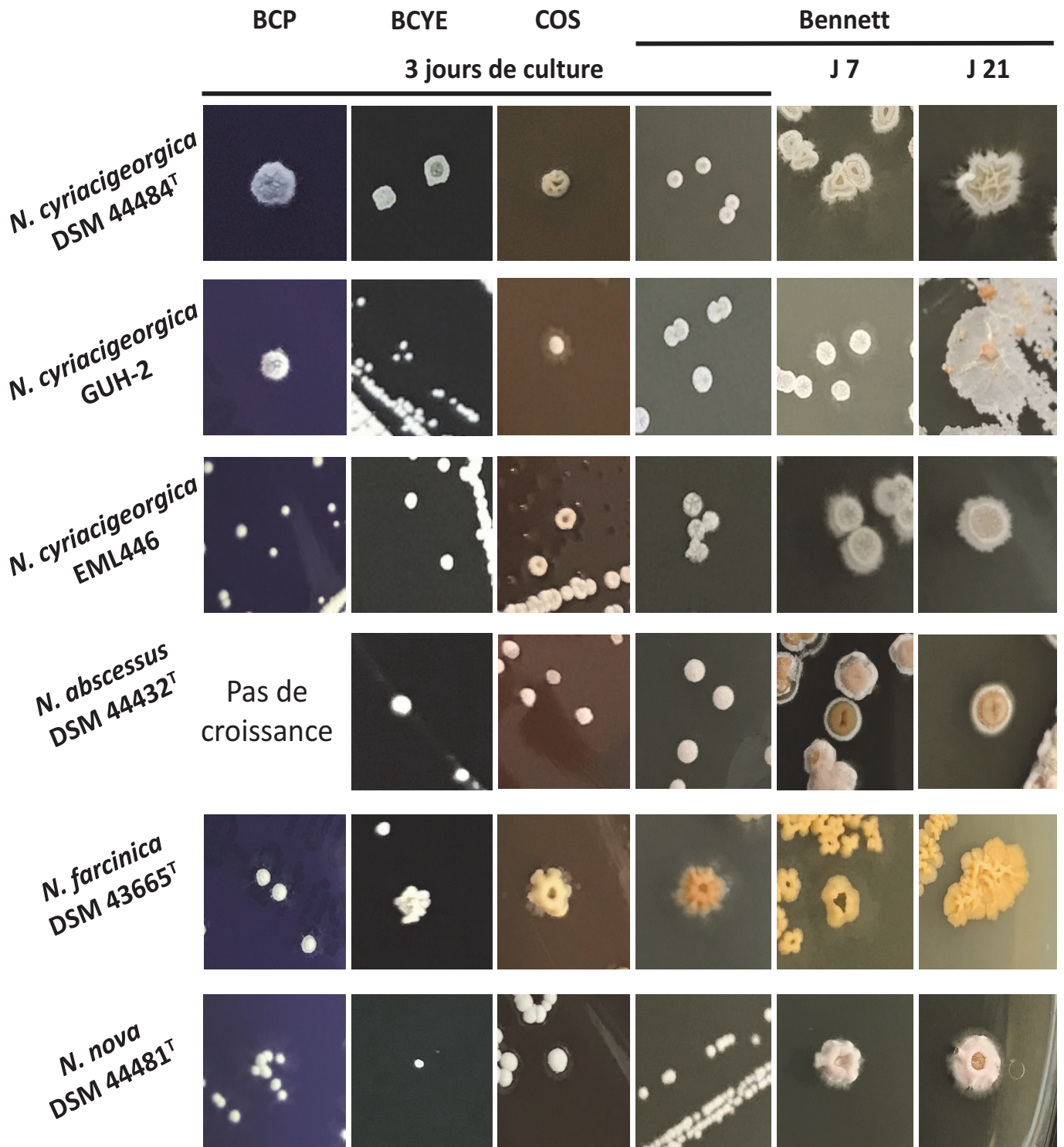


Figure 3.1. Aspects macroscopiques de cultures de *Nocardia cyriacigeorgica* DSM44484^T, GUH-2, EML446, *N. abscessus* DSM44432^T, *N. farcinica* DSM43665^T, *N. nova* DSM44481^T sur milieux de cultures BCP (bromocrésol pourpre), BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract), COS (Gélose Columbia au sang) et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

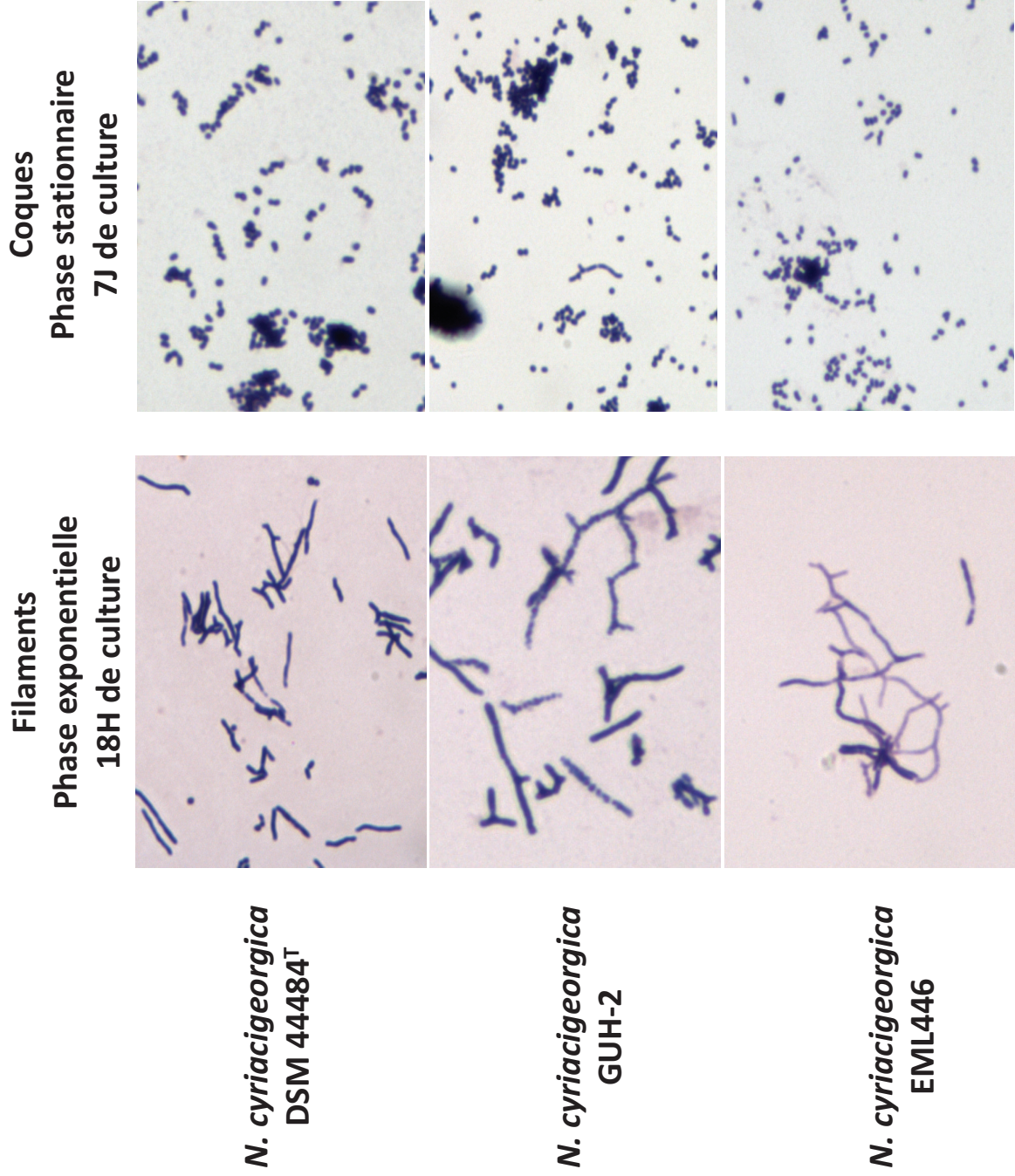


Figure 3.2. Aspects microscopiques de *Nocardia cyriaciageorgica* DSM44484^T, GUH-2, EML446 après une coloration de Gram après 18h (phase filamenteuse) et 7 jours (phase coccioïde) de croissance sur milieu Bennett

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 ^T	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 aérobie strictes, *i.e.* qu'il leur faut des conditions d'oxygénation normales (environ 20 % d'O₂) 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-alcane (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 (C₂₀), n-octacosane (C₂₈) et n-hexatriacontane (C₃₆)), les auteurs ont démontré la capacité de cet isolat à dégrader des n-alcane ayant des chaînes 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**).

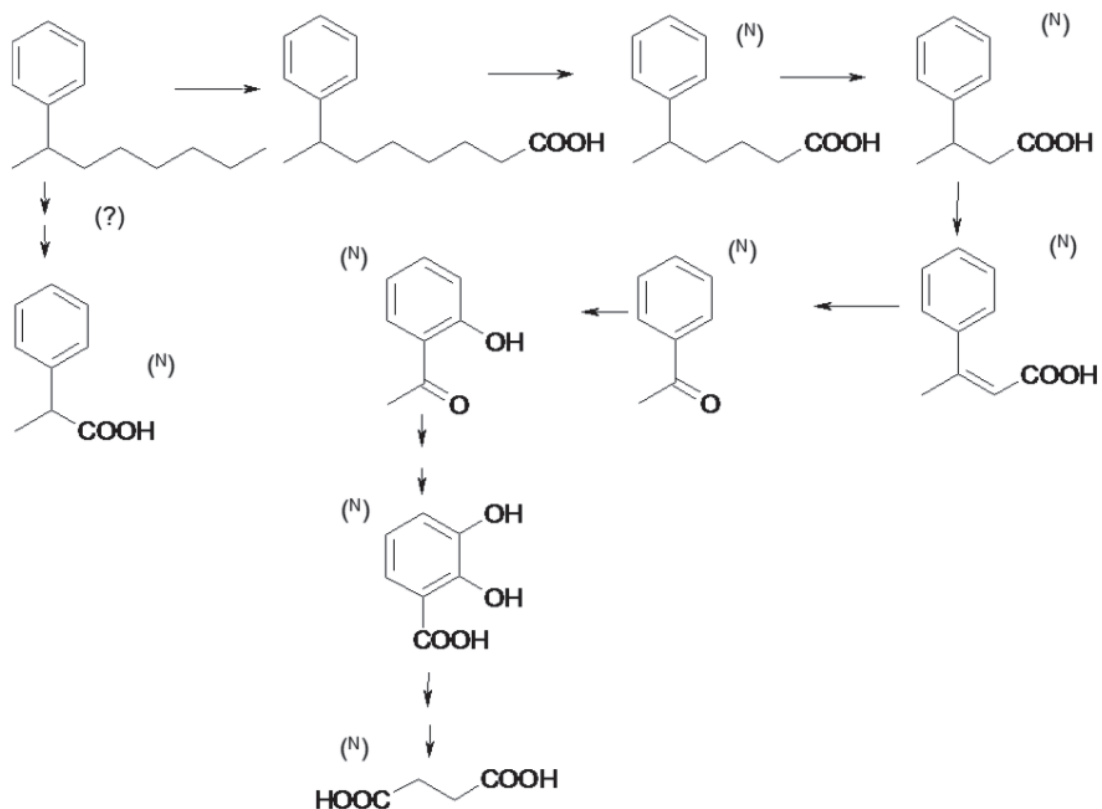


Figure 3.3. Voie métabolique de dégradation du *sec*-octylbenzène par *N. cyriacigeorgica* SBUG1472. (N) représente les métabolites identifiés par chromatographie en phase gazeuse, d'après [Nhi-Cong et al., \(2010\)](#)

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. Epidémiologie

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 (Mazzaferrri *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 récents 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. cyriaciageorgica</i> 12,9%	16S Noc1/Noc2 et hsp65 si besoin	Lebeaux et al., 2018
ESPAGNE	2005-2014	1119	<i>N. cyriaciageorgica</i> 25,3	<i>N. nova</i> 15,0%	<i>N. abscessus</i> 12,7%	<i>N. farcinica</i> 11,4%	16S entier et SecA1, hsp65 et gyrB si besoin	Valdezate et al., 2016
ITALIE	2011-2015	14	<i>N. cyriaciageorgica</i> 36%	<i>N. nova</i> 36%	<i>N. farcinica</i> 29%	-	16S entier	Mazzaferri et al., 2018
USA	2006-2011	1299	<i>N. nova</i> 43,6%	<i>N. cyriaciageorgica</i> 20,3%	<i>N. farcinica</i> 15,7%	<i>N. brasiliensis</i> 11,4%	16S entier	Schlager et al., 2014
CANADA	2004-2008	325	<i>N. nova</i> 18,0%	<i>N. farcinica</i> 10,6%	<i>N. brasiliensis/pseudobrasiliensis</i> 7,1%	<i>N. otitidiscaviarum</i> 4,3%	16S entier	Tremblay et al., 2011
AUSTRALIE	2010-2016	67	<i>N. nova</i> 29%	<i>N. cyriaciageorgica</i> 18%	<i>N. farcinica</i> 15%	-	NC	Paige & Spelman, 2019
TAÏWAN	1998-2010	100	<i>N. brasiliensis</i> 50%	<i>N. cyriaciageorgica</i> 18%	-	-	16S Noc1/Noc2	Liu et al., 2011
ALLEMAGNE	2005-2011	37	<i>N. farcinica</i> 21,6%	<i>N. asteroides</i> 18,9%	<i>N. cyriaciageorgica</i> 8,1%	-	16S	Ott et al., 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).

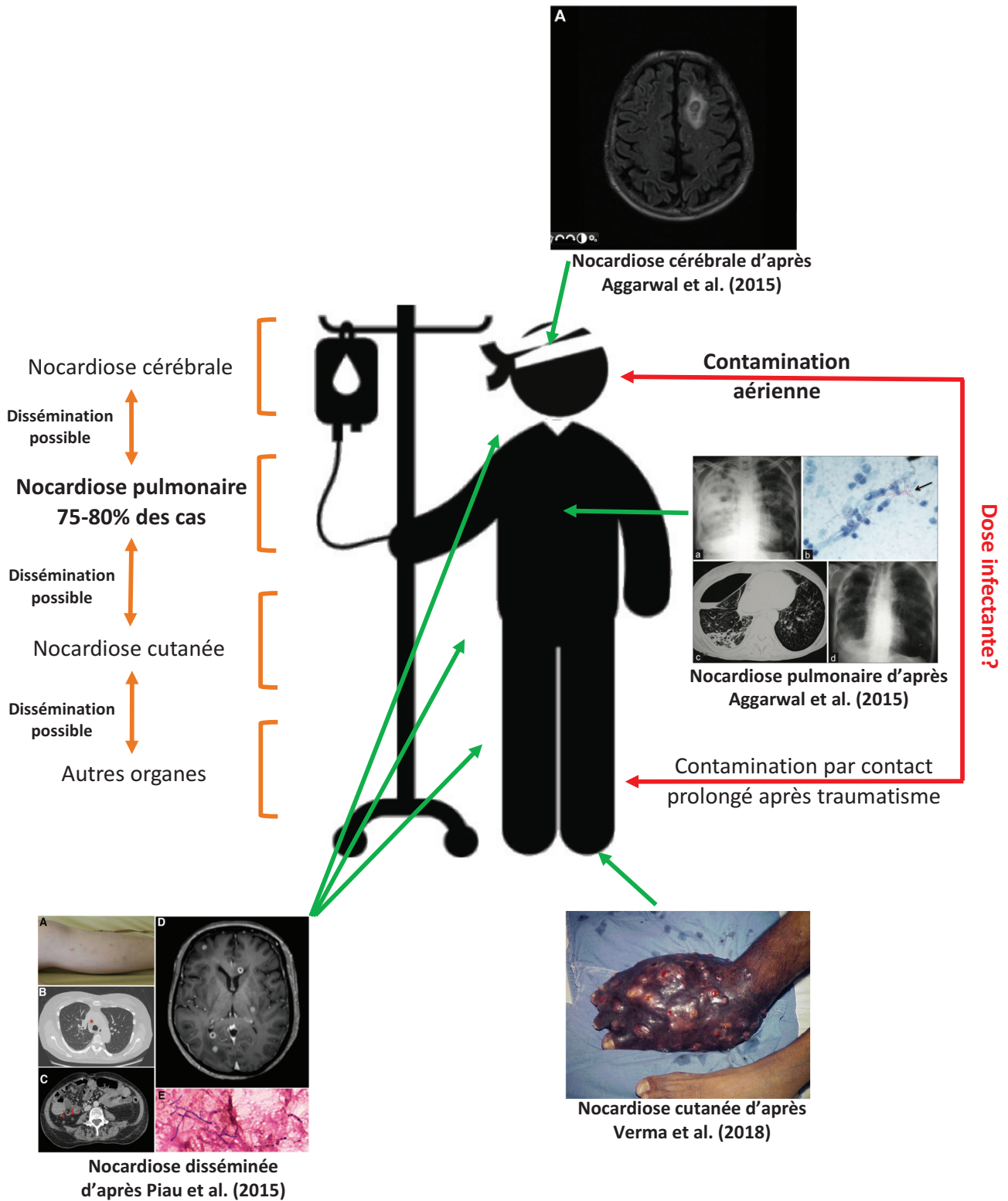


Figure 4.1. Les différentes formes de la nocardiose.

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.

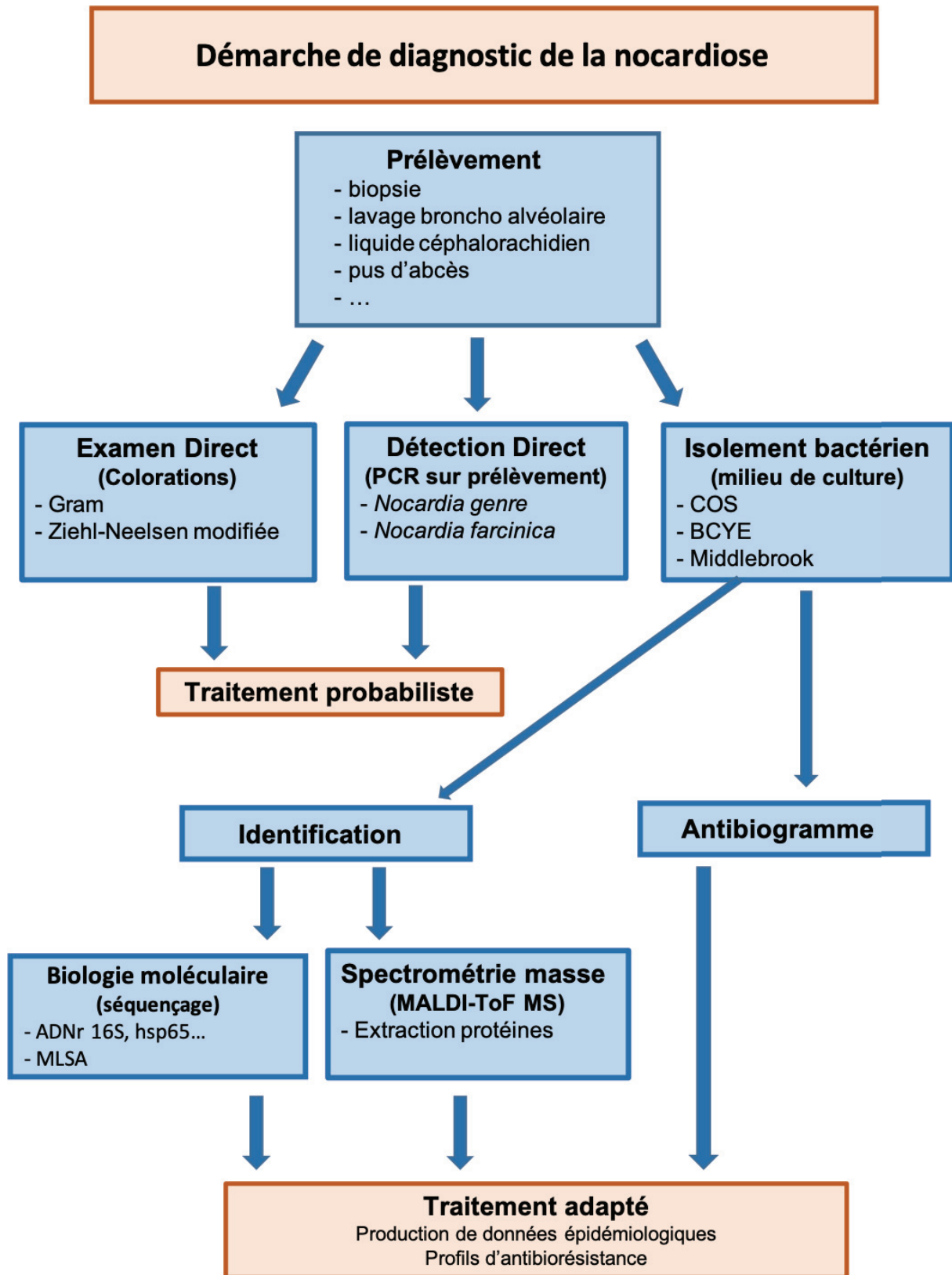


Figure 4.2. Démarche de diagnostic microbiologique d'une nocardiose

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 complété 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).

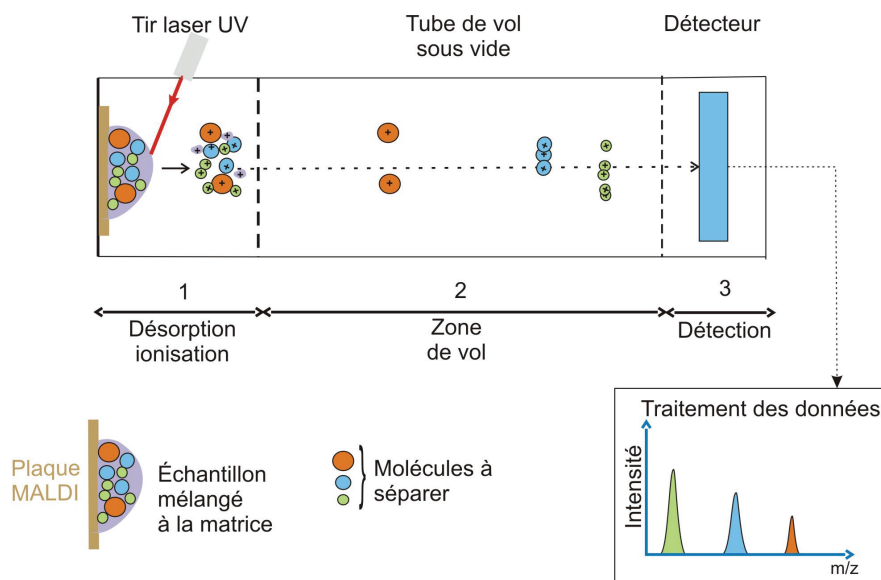


Figure 4.3. Principe de fonctionnement du MALDI-ToF MS (d'après <http://disciplines.ac-montpellier.fr/biotechnologies/ressources/microbiologie/identification-de-micro-organismes-par-spectrometrie-de-masse-maldi-tof-ms>)

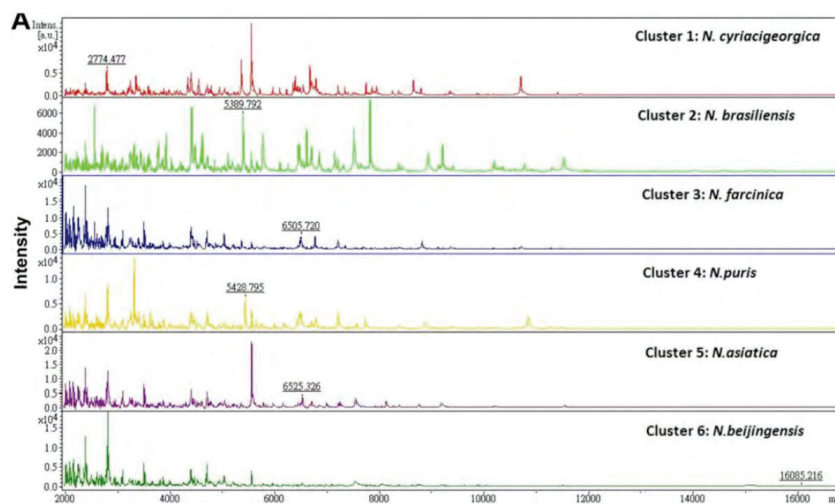


Figure 4.4. Spectres de masse de différentes espèces de *Nocardia* réalisés à l'aide du MALDI-ToF MS Bruker BioTyper (d'après [Hsueh et al., 2014](#))

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 ([Akçaglar 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^T 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^T 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.

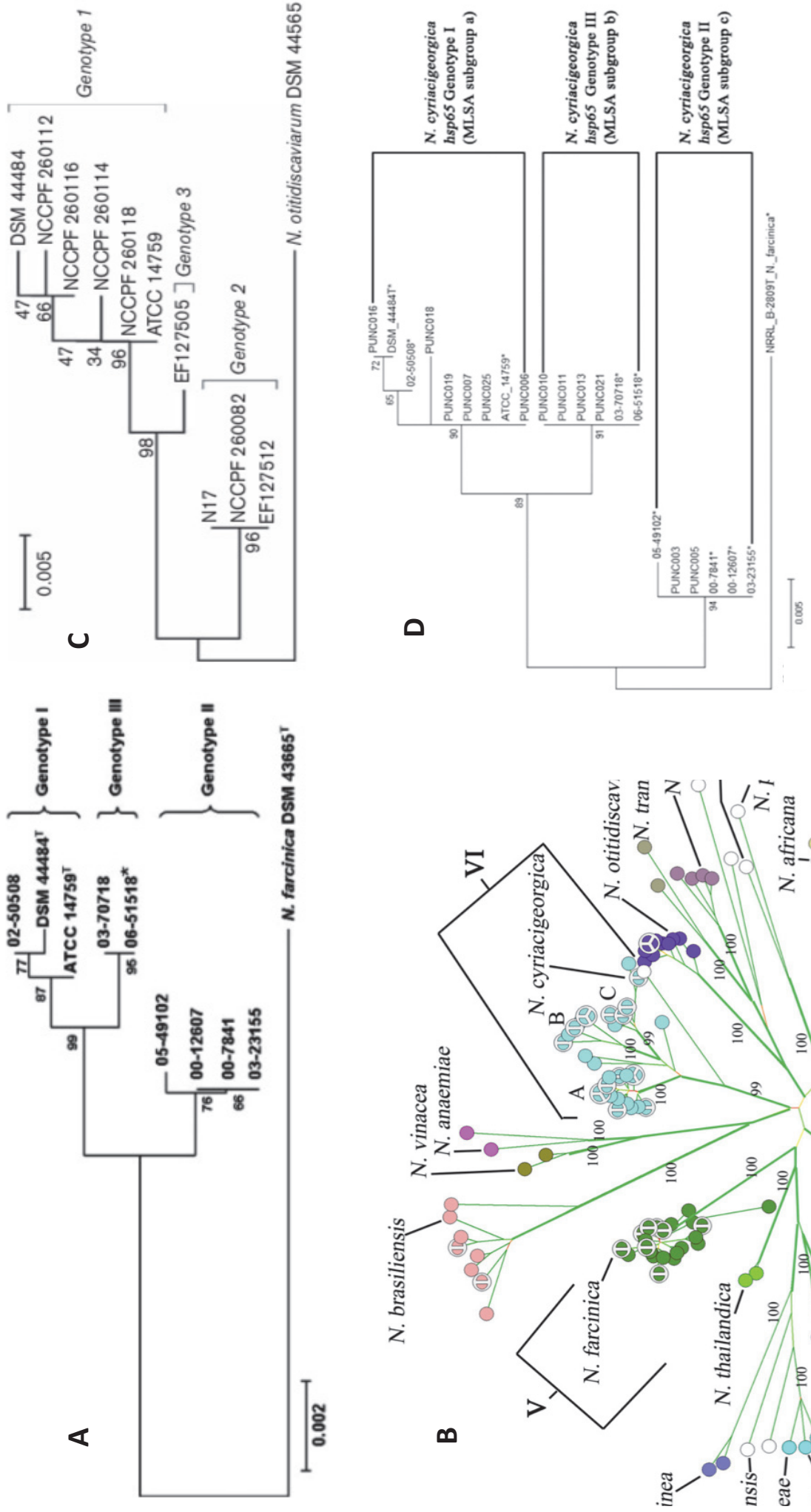


Figure 5.1. Phylogénie de *Nocardia cyriacigeorgica* montrant la diversité infra-spécifique. Les trois génotypes ont été décrits par (A) Schlager et al., (2008), (B) McTaggart et al., (2010), (C) Rudramurthy et al., (2015) et (D) Xiao et al., (2016)

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* (superoxyde 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 particulaire 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

Chapitre II : Phylogénie et physiopathologie de *N. cyriacigeorgica*

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^T.

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^T and *Nocardia cyriacigeorgica* DSM 44484^T » et paru dans la revue « *Microbiology Resource Announcements* ».

Article 1

GENOMES SEQUENCES OF TWO *N. CYRIACIGEORGICA* ENVIRONMENTAL ISOLATES, TYPE STRAINS *NOCARDIA* *ASTEROIDES* ATCC 19247^T AND *NOCARDIA* *CYRIACIGEORGICA* DSM 44484^T

Florian VAUTRIN^{1,2,4}, Emmanuelle BERGERON^{1,2}, Audrey DUBOST¹, Danis ABROUK¹, Benoit COURNOYER¹, Vanessa LOUZIER³, Thierry WINIARSKI⁴, Veronica RODRIGUEZ-NAVA^{1,2}, Petar PUJIC¹

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,^{a,b,d} Emmanuelle Bergeron,^{a,b} Audrey Dubost,^a Danis Abrouk,^a Christophe Martin,^a Benoit Cournoyer,^a Vanessa Louzier,^c Thierry Winiarski,^d Veronica Rodriguez-Nava,^{a,b} Petar Pujic^a

^aUMR CNRS 5557, INRA 1418 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, Villeurbanne, France

^bObservatoire Français des Nocardioses, Institut des Agents Infectieux (IAI), Centre de Biologie et Pathologie Nord, Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France

^cAgressions Pulmonaires et Circulatoires dans le Sepsis (APCSe), VetAgro Sup–Campus Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France

^dUMR 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](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Veronica Rodriguez-Nava, veronica.rodriguez-nava@univ-lyon1.fr, or Petar Pujic, 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^T and *N. cyriacigeorgica* DSM 44484^T, EML446, and EML1456

Isolate	BioProject no.	Accession no.	Genome size (Mbp)	G+C content (%)	No. of contigs	No. of reads	N_{50} value (Mbp)	Coverage level (×)	No. of CDS ^a	% coding proteins	No. of tRNAs	No. of rRNAs
<i>N. asteroides</i> ATCC 19247 ^T	PRJNA542835	VBUS00000000	6.6	70.0	18	13,451,664	1.51	301	6,498	91.4	50	2
<i>N. cyriacigeorgica</i> EML1456	PRJNA542859	VBUU00000000	6.8	68.0	108	16,883,270	0.15	370	6,906	89.7	49	2
<i>N. cyriacigeorgica</i> EML446	PRJNA542857	VBUT00000000	6.5	68.2	41	18,841,320	0.61	433	6,531	89.91	51	3
<i>N. cyriacigeorgica</i> DSM 44484 ^T	PRJNA542831	VBUR00000000	6.3	58.2	64	10,182,338	0.19	487	6,072	89.8	48	3

^aCDS, coding sequences.

was washed in 70% ethanol, air dried, and solubilized in 200 μ 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 2×300 -bp and 2×125 -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^T, 6.3 Mb for *N. cyriacigeorgica* DSM 44484^T, 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 Infiltron 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^{1,4,5}, Petar PUJIC¹, Christian PAQUET², Emmanuelle BERGERON^{1,4}, Delphine MOUNIEE¹, Thierry MARCHAL³, Hélène SALORD⁴, Jeanne-Marie BONNET-GARIN², Benoit COURNOYER¹, Thierry WINIARSKI⁵, Vanessa LOUZIER^{2,*}, Veronica RODRIGUEZ-NAVA^{1,4*}

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-Verin, France

* These authors contributed equally to this work

Soumis dans Environment International

Manuscript Details

Manuscript number	ENVINT_2019_4413
Title	Health hazards associated with Nocardia cells colonizing urban infiltration systems
Article type	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 1.0×10^3 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.

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

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

1 Health hazards associated with *Nocardia* 2 cells colonizing urban infiltration systems

3 Florian Vautrin^{a,d,e}, Petar Pujic^a, Christian Paquet^b, Emmanuelle Bergeron^{a,d}, Delphine
4 Mounié^a, Thierry Marchal^c, Hélène Salord^d, Jeanne-Marie Bonnet-Garin^b, Benoit Cournoyer^a,
5 Thierry Winiarski^e, Vanessa Louzier^{b*}, Veronica Rodriguez-Nava^{a,d*}

6
7 ^a UMR Ecologie Microbienne, CNRS 5557, INRA 1418, Research team on « bacterial
8 opportunistic pathogens and environment », VetAgro Sup and University Lyon 1, F-69363
9 Lyon, France; ^b APCSe, Agressions Pulmonaires et Cardiovasculaires dans le Sepsis, VetAgro
10 Sup – Campus vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l’Etoile, France; ^c Laboratoire vétérinaire
11 d’histopathologie, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l’Etoile, France;
12 ^d Observatoire Français des Nocardioses, Institut des Agents Infectieux (IAI), Centre de
13 Biologie et Pathologie Nord, Hôpital de la Croix-Rousse, 69317 Lyon, France; ^e UMR LEHNA,
14 CNRS 5023, ENTPE, University Lyon 1, F-69622 Villeurbanne, France. * These authors
15 contributed equally to this work.

16
17 **Address correspondence to:** Veronica Rodriguez-Nava, UMR Ecologie Microbienne, CNRS
18 5557, INRA 1418, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex, France. E-mail:
19 veronica.rodriquez-nava@univ-lyon1.fr **and** Vanessa Louzier, APCSe, Agressions
20 Pulmonaires et Cardiovasculaires dans le Sepsis, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon,
21 69280 Marcy l’Etoile, France. E-mail: vanessa.louzier@vetagro-sup.fr

22 **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 1.0×10^3 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 m³. 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

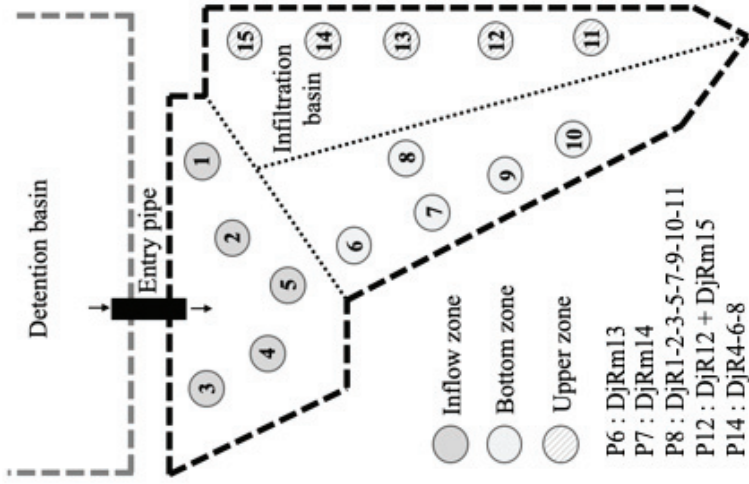
127 to (Li et al., 2010), while PAHs in no polluted soils were monitored at 4 to 12 µg/kg (Muntean
128 et al., 2015).

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).

421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461

136



137

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).

522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562

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	GCITTAACACATGCAAG TCG	Noc2	GAAATTCACAGTCTCCCC 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	CTTGTCGAACCCGCATA 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 GGACAGYAGTGGAT GGGYCGSGTGCACCG	SecA2	CAGGAAACAGCTATG ACGCGGACGATGTAG 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

152
153
154

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 corrplot
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.

623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663

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 ^d	PI
OFN.13	02.2015	Skin abscess	Yes	Lung ^d	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 ^d	PII
OFN.1	02.2013	Blood culture	No	Lung ^d	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

176
177

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

DjRm.14 07.2016 UJB *hsp65* metabarcoding - Bottom PIII

178

179 Note: ^d indicates a disseminated case of nocardiosis

180

* is from a patient of the Lyon area near the infiltration basin

181

705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764

182 2.5. Phylogenetic analysis

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

197 Bacterial DNAs of these strains were extracted by the boiling method using
198 achromopeptidase (10 U.µL⁻¹, Sigma-Aldrich). Amplifications of the following genes were
199 performed: *16S rRNA* (*rrs*), *hsp65*, *sodA*, *secA1*. PCR were performed using PuReTaqTM
200 Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) in a final volume of 25 µL with 200 ng of DNA.
201 Primers and PCR conditions are listed in Table 1. Size of the PCR fragments were respectively
202 569 bp for *rrs*, 401 bp for *hsp65*, 406 bp for *sodA* and 469 bp for *secA1*. PCR products were
203 sequenced by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). Multiple alignments were generated by
204 ClustalW using Seaview version 4.4.2 (Gouy et al., 2010). Only for the phylogenetic analysis
205 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^T 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.

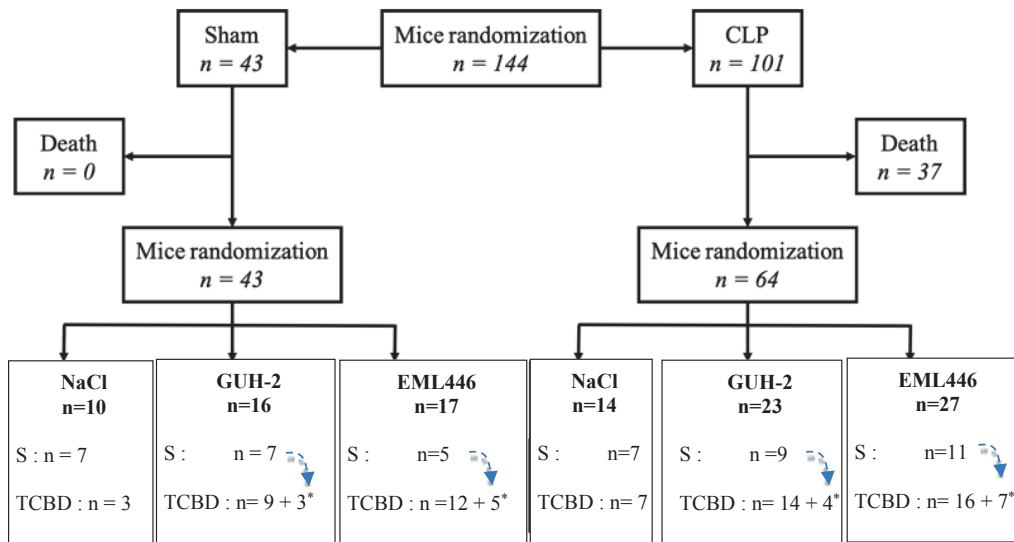
820
821
822
823
824

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.

885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944



247
248
249
250
251
252
253
254
255

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).

945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004

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 ^{b)}
	10	4
	33	5
	41	7 *, c)

256 **Figure 2B:** Mice distribution for the Time Course Bacterial Detection experiment (TCBD). *
257 = Surviving mice from the end of the Survival experiment retrieved at the end of the TCBD
258 one. a) lungs of two mice will be reserved for histological analysis, b) lungs of one mouse will
259 be reserved for histological analysis. c) lungs of three mice and brains of two mice will be
260 reserved for histological analysis.

261 Strains GUH-2 and EML446 were cultivated in BHI medium and adjusted to 2.0×10^7
262 CFU/mL to provide an instillation of 1.0×10^6 bacteria in 50 μ L of physiological saline. To
263 determine this dose of bacteria, considered as the sublethal one, prior studies were performed
264 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
1016 269 they were found in a moribund state identified by the inability to maintain an upright position
1017
1018 270 associated or not with labored breathing and cyanosis. Classical signs of distress, such as
1019
1020 271 anorexia and weight loss (> 20%), hunching, prostration, impaired motility, labored breathing,
1021
1022 272 ruffled haircoat, and dehydration, were assessed. Mice exhibiting at least four of these criteria
1023
1024 273 were euthanized via isoflurane (5%) anesthesia followed by cervical dislocation. Mice
1025
1026 274 exhibiting less than four of these criteria were re-inspected each 8 hours. Then, if the conditions
1027
1028 275 of the mice worsened, they were euthanized. Surviving mice were used for detection of
1029
1030 276 *Nocardia* cells at days 33 and 41. Survival curves (Kaplan–Meier plots) were compared by log
1031
1032
1033 277 rank test and performed on Prism8 software. P values < 0.005 were considered statistically
1034
1035 278 significant.

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
1055 287 2014).

1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064

1065
1066
1067 288 Crushed organs (lung, kidneys, brain, spleen and liver) diluted in 4.5 mL of a saline
1068
1069 289 physiological solution, and serially diluted (10^{-1} to 10^{-4}) was used to estimate *Nocardia* plate
1070
1071 290 count numbers. These plate counts were performed on BHI agar medium after a validation of
1072
1073 291 the bacterial colonies using a *Nocardia*-specific PCR (NG1/NG2 primers (Table 1)). DNA
1074
1075 292 extracts were produced from 200 μ L of the above crushed organs using the NucleoSpin[®] Tissue
1076
1077 293 kit (Macherey-Nagel, France). The *Nocardia*-specific PCR was then applied on these extracts
1078
1079 294 to verify the presence of *Nocardia* cells in these organs.
1080
1081
1082

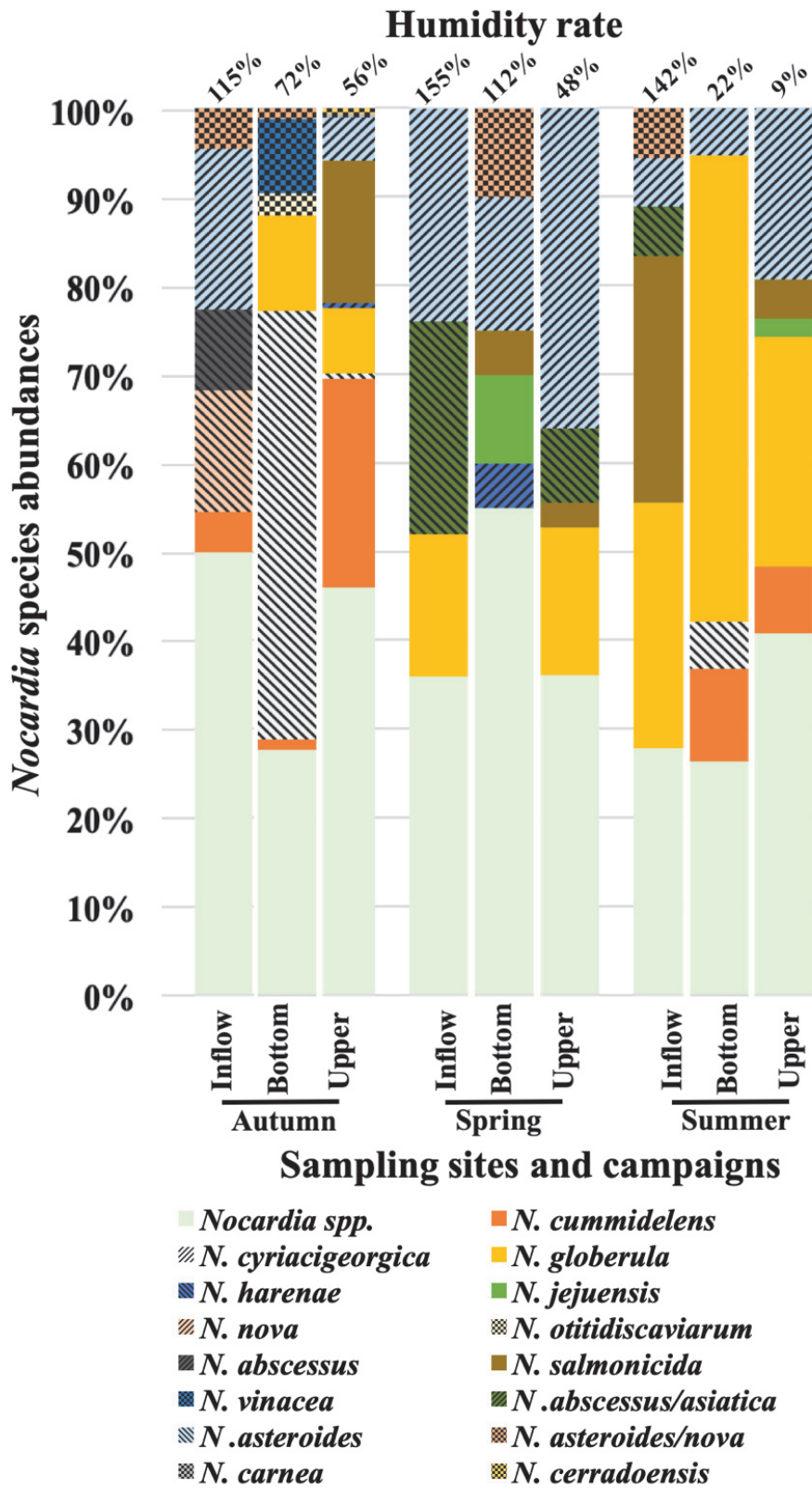
1083 295 **3. Results**

1084 1085 1086 296 *3.1. Spatio-temporal variability of Nocardia cells in soils from an infiltration basin*

1087
1088
1089 297 Prior comparing the distribution of *Nocardia* cells between areas of the SIS and sampling
1090
1091 298 periods, a few parameters were monitored for each sampling point. Soil water content of the
1092
1093 299 SIS was quite variable between the three sampled areas and campaigns, varying from 9% in the
1094
1095 300 upper zone in summer to saturation (155%) in the inflow zone in spring (Figure 3). General
1096
1097 301 trend was a higher moisture, at least 115%, in the inflow zone, and a lower water content, not
1098
1099 302 higher than 56%, in the upper zone. Granulometry did not exhibit much variability between
1100
1101 303 samples, with a relative mean sand content of 55-60% and a clay content of 40-45% (data not
1102
1103 304 shown). Regarding metal trace elements, they have been shown to be constant over the time:
1104
1105 305 Zn concentration remained around 0.5 mg/L and it was the highest concentration detected when
1106
1107 306 comparing to other elements that respect the following relationship: Cd < Pb < Cu < Zn (data
1108
1109 307 not shown). These pollutants were more abundant in the bottom zone than in the inflow and
1110
1111 308 upper zones (p-value = 0.0195) (**Figure 4 A**). The PAHs, taken individually, harbored two
1112
1113 309 behaviors for 12 out of 16. So they were clustered according to the zone (fluoranthene, pyrene,
1114
1115 310 phenanthrene, benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, hereafter “5 PAHs”) or the period of
1116
1117 311 sampling (naphthalene, acenaphthene, fluorene, benzo(b)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene,
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124

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 = 6.97×10^{-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

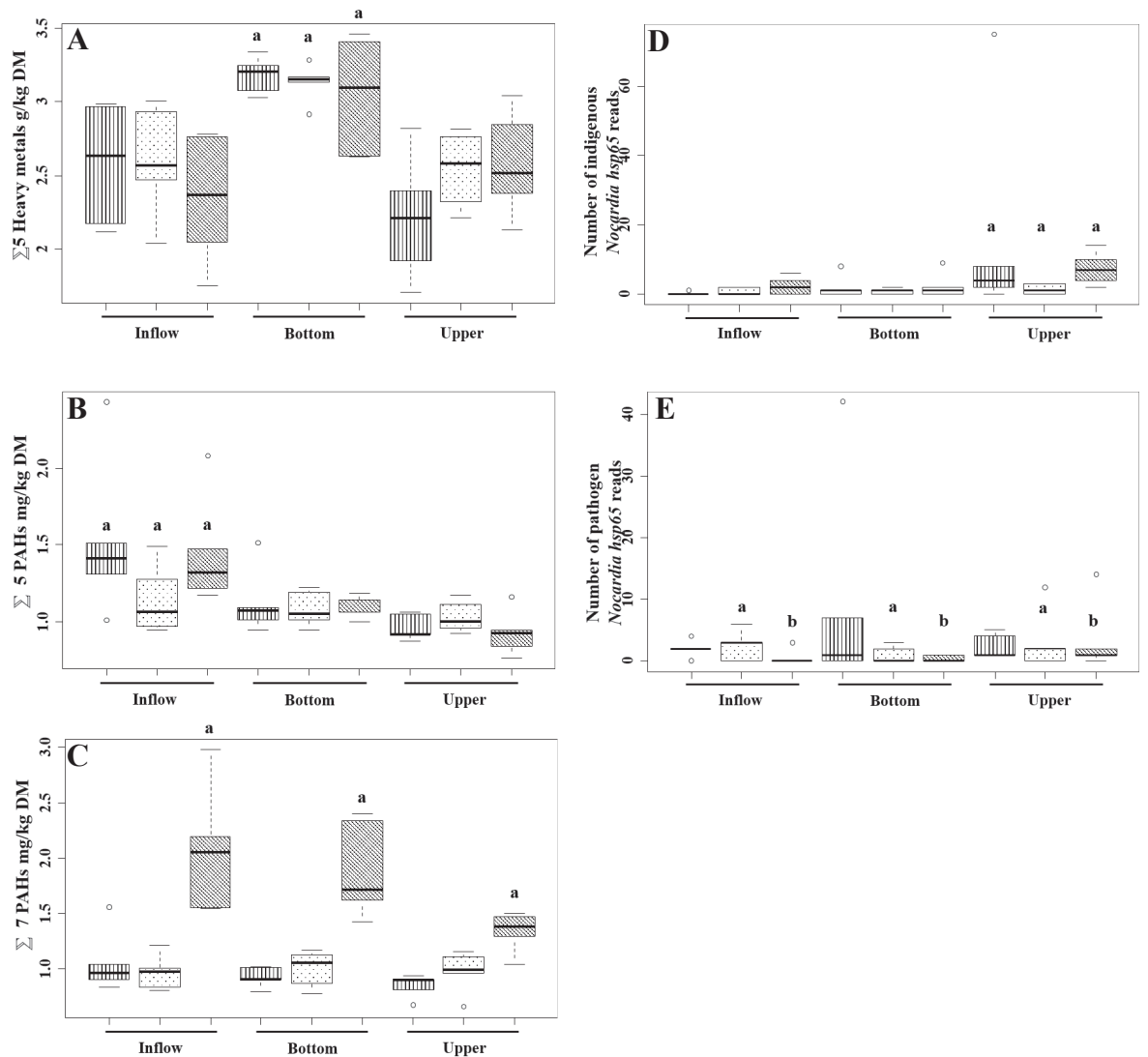
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244



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 = 6.97×10^{-6} . **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 349 the most frequently found in French epidemiology. In autumn, the most prevalent *Nocardia*
1368
1369 350 species in the SIS (inflow, bottom, upper zones) were *N. cyriacigeorgica* and *N. nova* (very
1370
1371 351 frequent human pathogens) together with *N. asteroides* and *N. cunmideleus*. A segregation
1372
1373 352 between zones was observed (Figure 3). *N. cyriacigeorgica hsp65* reads were mainly observed
1374
1375 353 in the driest parts of the DRIB, while *N. nova* reads were mainly in the water saturated samples.
1376
1377
1378 354 In spring, *N. asteroides hsp65* reads were observed in the three zones, and this species appeared
1379
1380 355 to be the most prevalent in this environment. Reads from nonpathogenic *N. globerula* and the
1381
1382 356 complex *N. abscessus/asiatica* (human pathogens) were also obtained in high numbers in the
1383
1384 357 inflow and upper zones. In summer, most of the detected species were non-pathogenic ones: *N.*
1385
1386 358 *globerula* showed the highest number of reads over the DRIB, but *N. salmonicida* (a fish
1387
1388 359 pathogen) reads were higher in the inflow zone (see Figure 3 for a summary of the taxonomic
1390
1391 360 allocations).

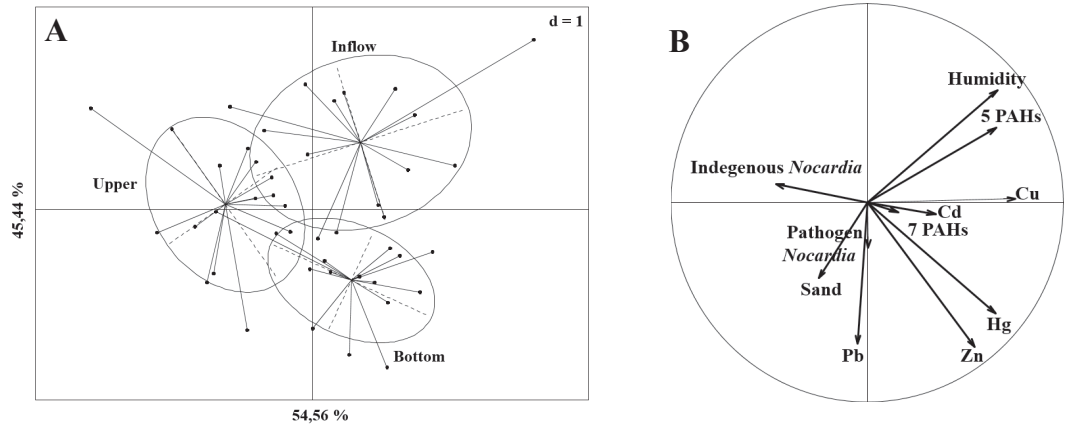
1392
1393
1394 361 **Table 3.** Diversity and richness indices of the metabarcoding analysis
1395 362

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

1417
1418 363 Regarding the distribution of OTUs per species, some were repeatedly observed from one
1419
1420
1421
1422
1423
1424

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

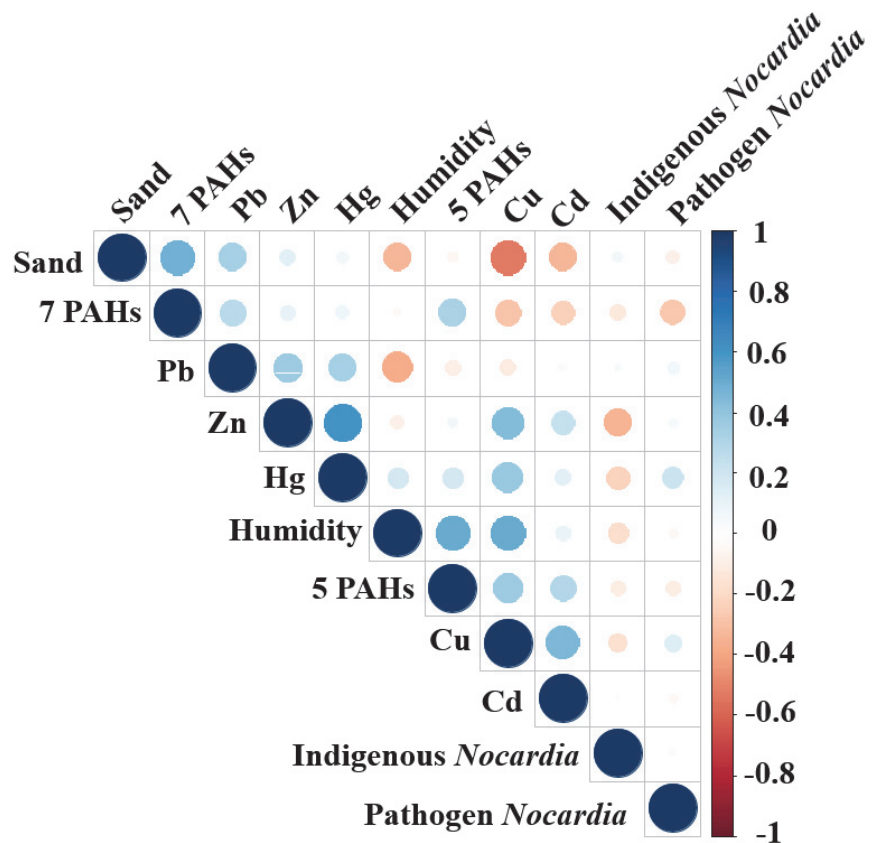
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544



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

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

1545
 1546
 1547
 1548
 1549
 1550
 1551
 1552
 1553
 1554
 1555
 1556
 1557
 1558
 1559
 1560
 1561
 1562
 1563
 1564
 1565
 1566
 1567
 1568
 1569
 1570
 1571
 1572
 1573
 1574
 1575
 1576
 1577
 1578
 1579
 1580
 1581
 1582
 1583
 1584
 1585
 1586
 1587
 1588
 1589
 1590
 1591
 1592
 1593
 1594
 1595
 1596
 1597
 1598
 1599
 1600
 1601
 1602
 1603
 1604



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 1.0×10^3 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

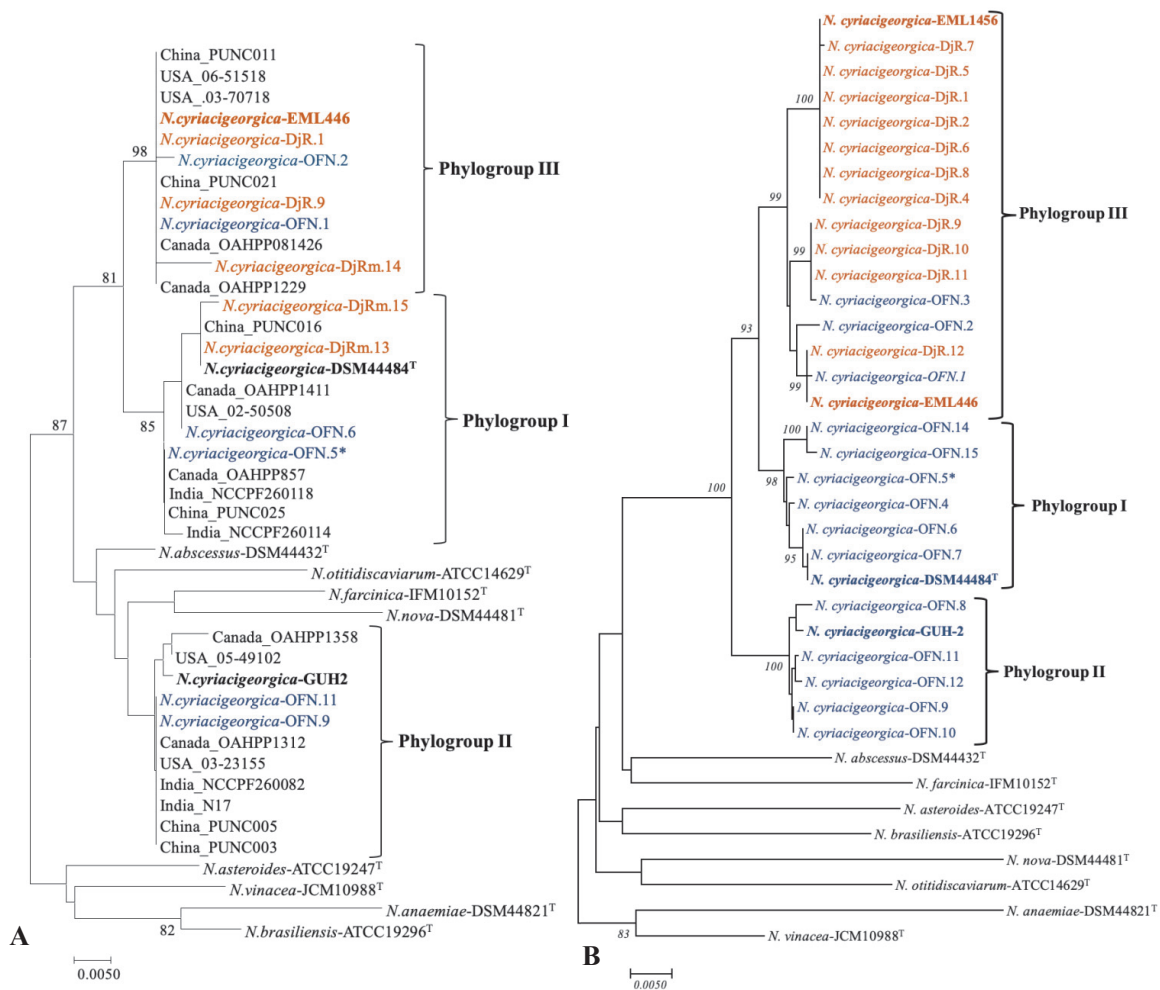
1605
1606
1607 406 sediment sample collected in 2013. The DjRm13-15 are sequences identified according to the
1608
1609 407 metabarcoding analysis on the sampled sediments of the DRIB (2015-2016). Location of these
1610
1611 408 isolates and sequences over the DRIB is indicated on Figure 1. Deeper taxonomic 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 [Schlaberg 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 430 clinical strains. Bootstrap values were >80 only for PI (85) and PIII (98) (Figure 7a).
1668
1669
1670 431 For *sodA* and *secA1*, the phylogenetic tree structures were in agreement with the one
1671
1672 432 derived from *hsp65* gene (data not shown). The MLSA phylogenetic tree of concatenated genes
1673
1674 433 increased the reliability of the groupings (Figure 7B). This tree better resolved the relatedness
1675
1676 434 of the SIS isolates with the clinical strains. Low infra-specific divergences were observed
1677
1678 435 within PI (similarity mean = 99.7%, min-max = 99.4-100%) and PII (similarity mean = 99.8%,
1679
1680 436 min-max = 99.6-100%). In PIII, infra-specific divergences were higher (mean identities =
1681
1682 437 99.5%, min-max = 99.2%-100%) (Table 4). The MLSA tree showed a clear differentiation of
1683
1684 438 the SIS genotypes into at least three large clonal complexes, with two complexes grouping most
1685
1686 439 of the clinical isolates from the French Observatory of Nocardiosis (PI and PII) and PIII
1687
1688 440 grouping three clinical isolates involved in pulmonary infections and most of our environmental
1689
1690 441 strains (PIII).
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

1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784



442
443
444
445
446
447
448
449
450

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 454 environmental strains are colored in orange.
1794
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

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

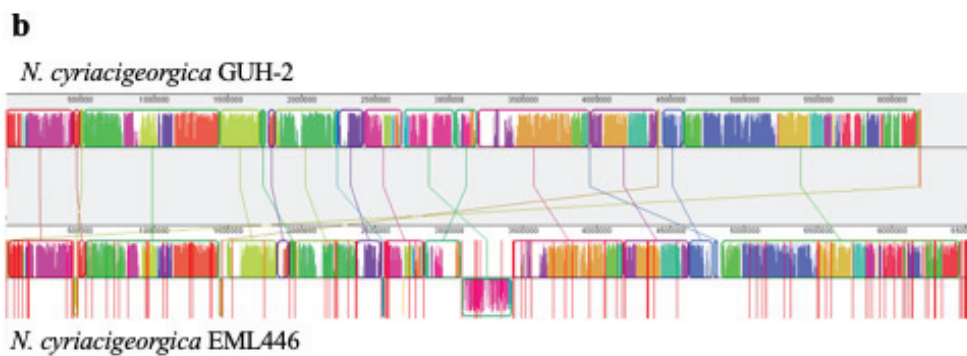
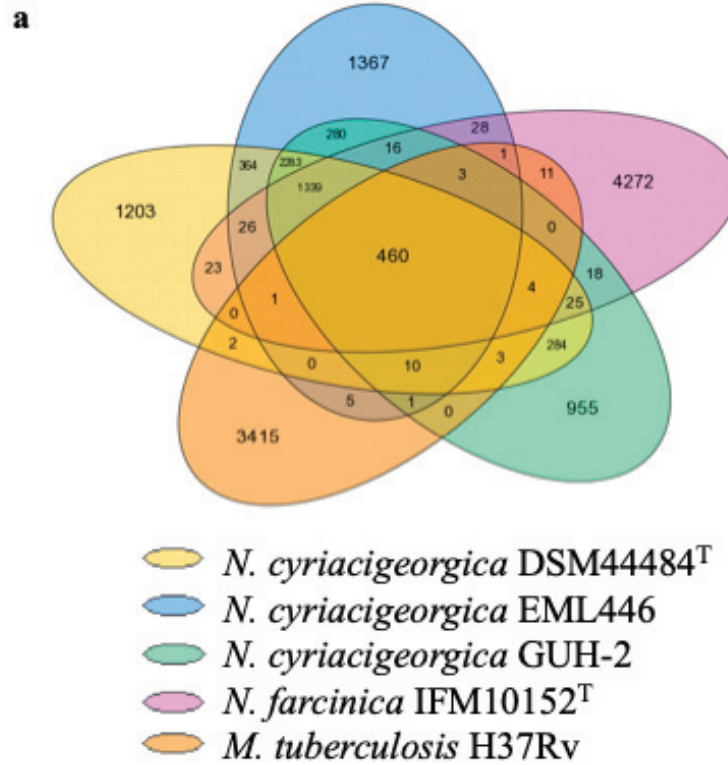
Phylogroups	Similarity	<i>rrs-hsp65-sodA-secA1</i>	<i>rrs</i>	<i>hsp65</i>	<i>sodA</i>	<i>secA1</i>
Phylogroup I	Similarity range (%)	99.4-100	100-100	99.8-100	99.8-100	99.7-100
	Similarity average (%)	99.7	100	99.9	99.9	99.9
Phylogroup II	Similarity range (%)	99.6-100	100-100	99.8-100	99.9-100	99.7-100
	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^T, and *N. farcinica* IFM10152^T and *M. tuberculosis* H37Rv
468 (Figure 8a). The EML446 genome shared 4,392 CDSs with GUH-2 and 4,883 with
469 DSM44484^T. GUH-2 and DSM44484^T shared 4,408 CDSs, and the number of shared CDSs
470 between any *N. cyriacigeorgica* strain and *N. farcinica* IFM10152^T 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



478

479 **Figure 8.** Comparison of *N. cyriacigeorgica* EML446 genome with other actinomycetal
 480 reference genomes. (a) Venn Diagram representing the number of shared CDSs between whole
 481 genomes of *Nocardia cyriacigeorgica* DSM44484^T, *N. cyriacigeorgica* EML446, *N.*

2006	
2007	
2008	482
2009	<i>cyriacigeorgica</i> GUH-2, <i>N. farcinica</i> IFM10152 ^T and <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv. (b)
2010	483
2011	MAUVE comparison between EML446 and GUH-2 genomes showing the position of RGPs
2012	484
2013	(regions of genomic plasticity).
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	

2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106

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

Virulence CDSs	<i>N. cyriacigeorgica</i> EML446	<i>N. cyriacigeorgica</i> GUH-2	<i>N. farcinica</i> IFM10152 ^T	<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

488

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., \(2013\)](#).

489

490

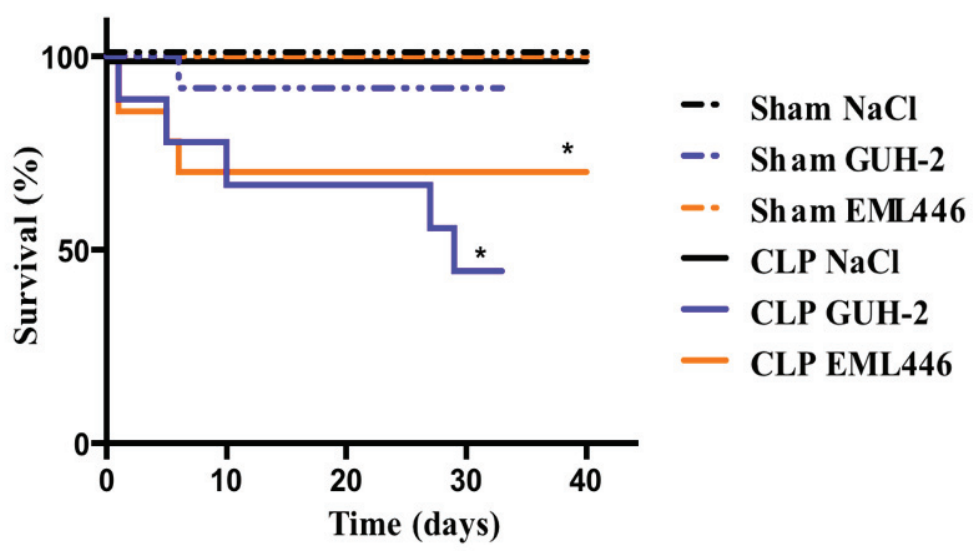
491

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 1.0×10^6
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

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

512 The TCBD experiment showed that in the Sham-operated group, soon after intratracheal
513 instillation, the lung was the primary infection site of *Nocardia*, but other organs were also
514 affected. At D4, 4/5 Sham-GUH-2 mice presented *Nocardia* in the lungs; in two of them,
515 *Nocardia* was detected in all the studied organs (Figure 10). Only in one mouse, *Nocardia* could
516 not be detected. At D10 and D33, the number of organs positive for *Nocardia* decreased except
517 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).
518 For the Sham-EML446 mice, the occurrence rate and dissemination were lower than for the
519 Sham-GUH-2 mice. At D4, *Nocardia* was found in the lungs of 3/5 mice, but the incidence in
520 other organs was lower (1/5) and even null in the brain and spleen. At D10, only 1/5 mice
521 presented *Nocardia* in each organ, and nothing was detected at D33. However, *Nocardia* was
522 found in all organs of one mouse at D41.

2227
2228
2229
2230
2231
2232
2233
2234
2235
2236
2237
2238
2239
2240
2241
2242
2243
2244
2245
2246
2247
2248
2249
2250
2251
2252
2253
2254
2255
2256
2257
2258
2259
2260
2261
2262
2263
2264
2265
2266
2267
2268
2269
2270
2271
2272
2273
2274
2275
2276
2277
2278
2279
2280
2281
2282
2283
2284
2285
2286

		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 ^{H n=2}	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 ^{H n=1}	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 ^{H n=3}	7/7	4/5 ^{H n=2}	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 %

523

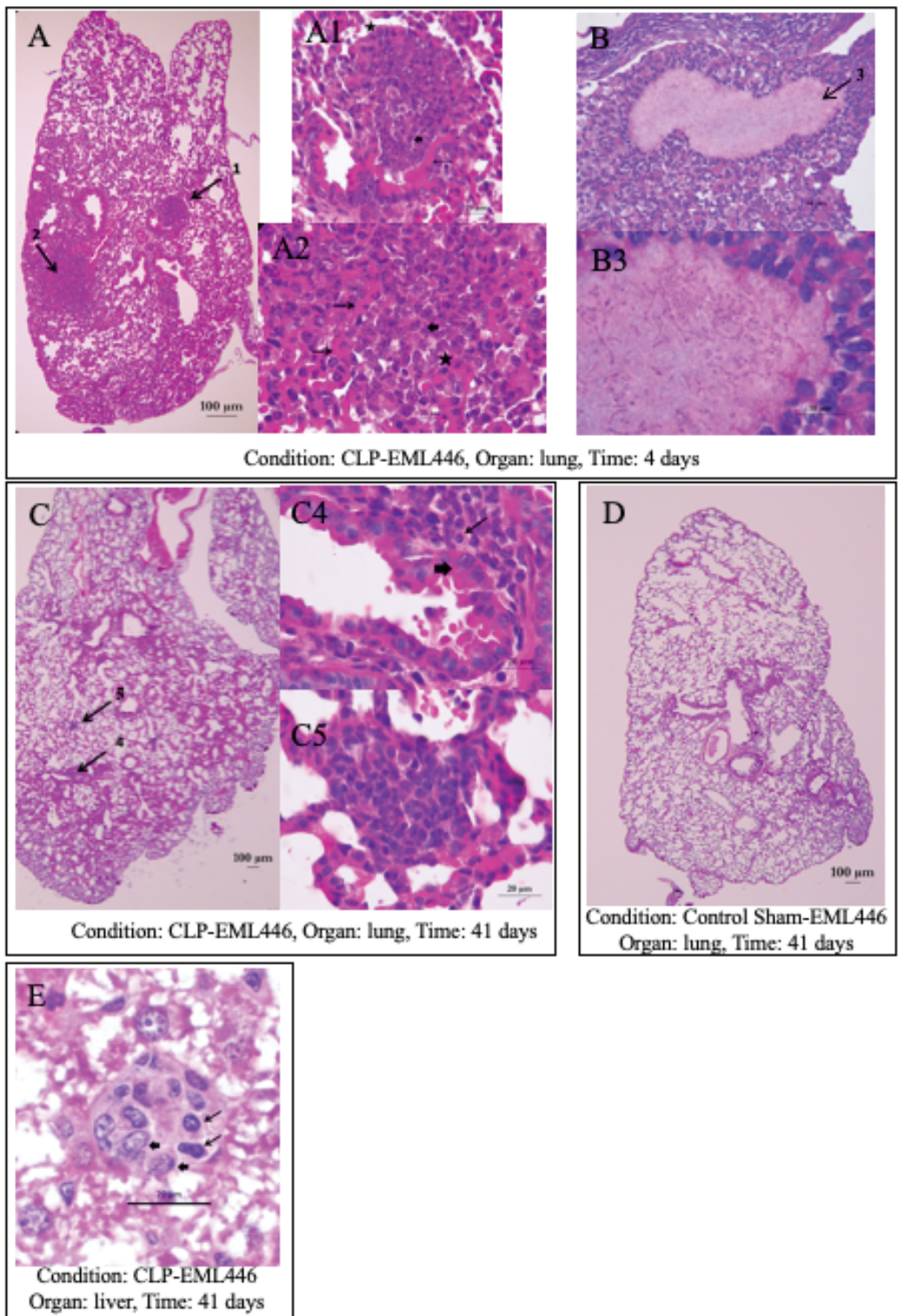
524 **Figure 10.** Heatmap representing rates of contaminated mice by *N. cyriacigeorgica* and
525 detected with specific *Nocardia*-genus PCR. Mice were sacrificed 4, 10 and 33 days after
526 instillation for the GUH-2 strain and until 41 days for the EML446 strain. Lungs, brain, kidneys,
527 spleen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

533 In the CLP-operated group, at D4, the presence of *Nocardia* was observed in all of the
534 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 **Figure 11.** Histological lung and liver sections of CLP-EML446 mouse at days 4 and 41 after
2410 intratracheal instillation. **A, B: CLP-EML446 mouse lung at day 4.** Light micrographs of
2411 mouse lung section with evidence of granulomatous process characterized by both
2412 inflammatory response (**A**) and necrosis usually present in nocardiosis (**B**). **A:** Two early
2413 pyogranulomas disseminated in the pulmonary parenchyma (arrows). Original magnification:
2414 obj. 4 X, lungs, postcaval lobe. **A1:** enlargement of the pyogranulomas (arrow 1). Multiple
2415 degenerated neutrophilic polymorphonuclear cells into a lung alveolus lumen admixed with
2416 few macrophages. Some inflammatory cells overflow in the lumen of a bronchus. Thin arrow:
2417 bronchus epithelium. Large arrow: neutrophilic polymorphonuclear cells. Star: macrophages.
2418 Original magnification: obj. 40 X. **A2:** enlargement of the pyogranulomas (arrow 2). Multiple
2419 degenerated neutrophilic polymorphonuclear cells into a lung alveolus lumen admixed with
2420 few macrophages. Thin arrows: alveolar wall. Large arrow: neutrophilic polymorphonuclear
2421 cells. Star: macrophages. original magnification: obj. 40 X. **B:** The lungs showed cavitory
2422 lesions constituted by central necrotic material surrounded by some polymorphonuclear and
2423 numerous macrophages. Macrophage alveolitis and interstitial lymphocytic infiltration are also
2424 observed. Light micrographs; hematoxylin–eosin staining; original magnification: obj. 40 X.
2425
2426 **B3:** High power magnification showing histologic sections of the lesion characterized by
2427 caseous necrotic central area with filamentous bacteria inside. Light micrographs;
2428 hematoxylin–eosin staining; original magnification: obj. 100 X. **C: CLP-EML446 mouse lung**
2429 **at day 41: C:** At day 41, some lymphocyte aggregates are present in the interstitium (arrows).
2430 Original magnification: obj. 4 X, lungs, postcaval lobe. **C4:** enlargement of the aggregate
2431 (arrow 4). Some small lymphocytes (thin arrow) infiltrate the interstitium beneath the bronchial
2432 epithelium (large arrow). Original magnification: obj. 100 X. **C5:** enlargement of the aggregate
2433 (arrow 5). Some small lymphocytes infiltrate the interstitium of the interalveolar wall. Original
2434 magnification: obj. 100 X. **D: Sham EML446 mouse lung at day 41.** no lesions. Original
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

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
2538 614 atmospheric pollution including high content in aerosolized dusts. These dusts can be generated
2539
2540 615 by several urban components such as motor engines, chemical industries, garbage incinerators,
2541
2542 616 stored garbage on sidewalks, plant and animal detritus, etc. They are accumulating on urban
2543
2544 617 surfaces and washed away with the runoff waters during rain events or aerosolized. Polluted
2545
2546 618 urban runoffs are nowadays transferred either to wastewater treatment plants (WWTP), SIS, or
2547
2548 619 natural waterways. These washed urban sediments can thus create novel growth conditions for
2549
2550 620 opportunistic human pathogens that are known to be well-adapted for a growth on chemical
2551
2552 621 pollutants. Results obtained in this study supported this hypothesis as high numbers of *N.*
2553
2554 622 *cyriacigeorgica* cells were observed among SIS sediments, and these cells were allocated to a
2555
2556 623 phylogroup harboring confirmed clinical strains that had been involved in lung infections.
2557
2558 624 Other pathogenic *Nocardia* species such as *N. abscessus* (associated mainly with cerebral and
2559
2560 625 pulmonary infections), *N. nova* (related with pulmonary and cutaneous cases), and *N.*
2561
2562 626 *ottidiscaviarum* (causing mainly cerebral infections and multidrug resistant) were also
2563
2564 627 identified among SIS through the use of a novel metabarcoding approach based on the *hsp65*
2565
2566 628 gene target. These species can thus also be disseminated through SIS and aerosolized deposits.
2567
2568
2569
2570
2571 629 Sediments analyzed from the DRIB showed variable water contents, high hydrocarbon
2572
2573 630 pollution and variable plant cover. The main pollution recorded in this urban environment is
2574
2575 631 due to PAHs. The high amount of PAHs has a pyrogenic origin according to the
2576
2577 632 phenanthrene/anthracene <10 and fluoranthene/pyrene >1 ratio for all the samples in
2578
2579 633 accordance with Budzinski et al., (1995) and Yunker et al., (2002). This pyrogenic origin could
2580
2581 634 be explained by the industrial activity in this area and the engine gasoline combustion. No
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
2598 639 river in Poland arising from runoff water and city waste combustion. The same phenomenon
2599
2600 640 was first described by Radke & Welte (1983) in oil wells in Canada. Five of the detected PAHs
2601
2602 641 (phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene) were already
2603
2604 642 reported by Winiarski et al., 2015) in the same DRIB as being specially more abundant for the
2605
2606 643 inflow zone which is confirmed by our study. On the other side, we observed a group of 7 PAHs
2607
2608 644 (naphthalene, acenaphthene, fluorene, benzo(b)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene,
2609
2610 645 benzo(ghi)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene) that are more abundant in summer regardless the
2611
2612 646 measured zone which agrees with the study of Belles et al., (2016) also in the same studied
2613
2614 647 system. Regarding the correlation between pollutants and abundancy of *Nocardia*, this high
2615
2616 648 amount of PAHs seems to inhibit the development of *Nocardia* species, while metal trace
2617
2618 649 elements are an explicative factor of pathogen species presence in the bottom zone of this
2619
2620 650 infiltration basin. Regarding the influence of PAHs in pathogenic *Nocardia*, the upper zone,
2621
2622 651 considered as the less contaminated zone, was the one with lowest counts in *N. cyriacigeorgica*.

2623
2624
2625
2626 652 Based on the *hsp65* metabarcoding analysis, water content was found to be explicative
2627
2628 653 of some distribution patterns. Shannon indices highlighted a high diversity within the sampled
2629
2630 654 sediments but similar values could indicate a low variability between the samples in a same
2631
2632 655 area. The lower diversity within the NP2 sample (according to its Shannon index) could be
2633
2634 656 explained by the low reads number, also explained by the high humidity rate of this sample
2635
2636 657 (max humidity $\geq 115\%$). In addition, the low values of Simpson diversity indices have shown a
2637
2638 658 not homogenous diversity revealing that some communities are much more abundant than
2639
2640 659 others (Table 3). In this study, we observed that a high water content ($\geq 112\%$) was related to

2641
2642
2643
2644
2645
2646

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
2688 677 Regarding the genomic analysis, the genome size of SIS *N. cyriacigeorgica* EML446
2689
2690 678 (6,530,670 bp) was found to be larger than the one of clinical GUH-2 (6,194,645 bp). In general,
2691
2692 679 opportunistic pathogens present in an environmental reservoir harbor a larger genome,
2693
2694 680 conferring a greater versatility in the use of nutrients and in the ability to resist at certain
2695
2696 681 environmental constraints (Moran, 2002). However, the differences in genome size between
2697
2698 682 EML446 and clinical GUH-2 are low, and not in favor of a size reduction related to greater
2699
2700 683 interactions with the human host. Furthermore, the content in virulence genes between these
2701
2702
2703
2704

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 1.0×10^6 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.
2870
2871
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

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 with the field conditions. Up to 39 sequences representing 6 OTUs were found for *N.*
2894 760
2895 *cyriacigeorgica* which makes this species the most worrisome in this kind of environments
2896 761
2897 taking into account its epidemiologic characteristics. This led us to perform rounds of isolation
2898 762
2899 of this bacterial species, and investigate more deeply their molecular epidemiology. A MLSA
2900 763
2901 approach demonstrated a close proximity between the SIS *N. cyriacigeorgica* isolates and the
2902 764
2903 clinical ones. However, these strains were mostly distributed in phylogroup III, and not
2904 765
2905 recorded in the phylogroup II harboring the most virulent isolate recorded so far *i.e.* GUH-2.
2906 766
2907 This suggested a significant diversification between these strains that could be indicative of a
2908 767
2909 distinct tropism for the human host. This led us to compare the full genome of one SIS isolate
2910 768
2911 with the one of GUH-2. No distinction in their virulence gene contents could be made,
2912 769
2913 suggesting similar virulence potentialities. Experimentations were performed to test the
2914 770
2915 virulence differences among these strains (and phylogroups). GUH-2 strain was shown to be
2916 771
2917 the most virulent isolate in an immunoparalysis CLP mice model but EML446, the SIS isolate,
2918 772
2919 was also confirmed to be significantly virulent. This fact further supports the idea that all strains
2920 773
2921 of this species can be pathogenic but with variable clinical outcomes. The GUH-2 lineage seems
2922 774
2923 to be on-going an adaptation for animal hosts including humans. These differentiations linking
2924 775
2925 phylogroups and virulence will now need to be tested on a larger number of strains. The
2926 776
2927 presence of pathogenic *Nocardia* is strongly correlated to metallic trace elements and they can
2928 777
2929 be suggested to be indicators of their presence. On the other hand, we have observed a negative
2930 778
2931 correlation between PAHs and pathogenic *Nocardia*, so these pollutants cannot be used as
2932 779
2933 indicators of these bacteria. Overall, this study shows that humid and polluted environments
2934 780
2935 such as UIBs may represent a health hazard for adjacent populations through either direct
2936 781
2937 exposure or through an aerosolization of dusts harboring *N. cyriacigeorgica* cells. These
2938 782
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 Petruccioli, 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 856 Deng, W., Long, Q., Zeng, J., Li, P., Yang, W., Chen, X., Xie, J., 2017. *Mycobacterium*
3153 857 *tuberculosis* PE_PGRS41 enhances the intracellular survival of *M. smegmatis* within
3154 858 macrophages via blocking innate immunity and inhibition of host defense. *Sci. Rep.* 7.
3155 859 <https://doi.org/10.1038/srep46716>
3156
3157 860 Eshraghi, S.S., Heidarzadeh, S., Soodbakhsh, A., Pourmand, M., Ghasemi, A., GramiShoar,
3158 861 M., Zibafar, E., Aliramezani, A., 2014. Pulmonary nocardiosis associated with cerebral
3159 862 abscess successfully treated by co-trimoxazole: a case report. *Folia Microbiol. (Praha)*
3160 863 59, 277–281. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0298-7>
3161
3162 864 Feldman, A.T., Wolfe, D., 2014. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining, in:
3163 865 histopathology, methods in molecular biology. Humana Press, New York, NY, pp. 31–
3164 866 43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3
3165
3166 867 Friendly, M., 2002. Corgrams: exploratory displays for correlation matrices. *Am. Stat.* 56,
3167 868 316–324. <https://doi.org/10.1198/000313002533>
3168
3169 869 Garcia-Bellmunt, L., Sibila, O., Solanes, I., Sanchez-Reus, F., Plaza, V., 2012. Pulmonary
3170 870 nocardiosis in patients with COPD: characteristics and prognostic factors. *Arch.*
3171 871 *Bronconeumol. Engl. Ed.* 48, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2012.06.006>
3172
3173 872 Gilbert, B., McDonald, I.R., Finch, R., Stafford, G.P., Nielsen, A.K., Murrell, J.C., 2000.
3174 873 Molecular analysis of the pmo (particulate methane monooxygenase) operons from two
3175 874 type II methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 966–975.
3176 875 <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.966-975.2000>
3177
3178
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>
3229
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
3254 918 Moran, N.A., 2002. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. Cell 108,
3255 919 583–586. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00665-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00665-7)
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 930 Desert. J. Basic Microbiol. 50, 241–253. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900358>
3272 931
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., Weiermüller, 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 Ghavimipanah, 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., Murriss,
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 Schlaberg, 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
3349 987 Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski,
3350 988 R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G.,
3351 989 Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-
3352 990 independent, community-supported software for describing and comparing microbial
3353 991 communities. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7537–7541.
3354 992 <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
3355
3356 993 Sébastian, 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
3390 1012 Vautrin, F., Bergeron, E., Dubost, A., Abrouk, D., Martin, C., Cournoyer, B., Louzier, V.,
3391 1013 Winiarski, T., Rodriguez-Nava, V., Pujic, P., 2019. Genome sequences of three
3392 1014 *Nocardia cyriacigeorgica* strains and one *Nocardia asteroides* strain. Microbiol.
3393 1015 Resour. Announc. 8, e00600-19, /mra/8/33/MRA.00600-19.atom.
3394 1016 <https://doi.org/10.1128/MRA.00600-19>
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

Chapitre II : Phylogénie et physiopathologie de *N. cyriacigeorgica*

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 T¹, Vautrin F², Bergeron E², Girard V³, Polsinelli S³, Monnin V³, Durand G³, Dauwalder O¹, Dumitrescu O¹, Laurent F¹, Rodríguez-Nava V^{1,2}

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>

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



 Springer

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".



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. Durand¹ · F. Vautrin² · E. Bergeron² · V. Girard³ · S. Polsinelli³ · V. Monnin³ · G. Durand³ · O. Dauwalder¹ · O. Dumitrescu¹ · F. Laurent¹ · V. Rodríguez-Nava^{1,2}

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

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

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

³ 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°C and were sub-cultured on two different media (bromocresol purple agar (BCP, bioMérieux Ref. 43021) and Columbia agar +5% sheep's blood (COS, bioMérieux Ref. 43041) at 37°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 μL loop full of organisms was transferred into a 1.5mL Eppendorf tube

containing 500 μL of 70% ethanol and approximately 200 μL 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 μL of 70% formic acid. The tube was briefly vortexed, 10 μL 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 μL 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 μL of α -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^T) 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 ^T
<i>N. nova</i>	26	DSM 43256 ^T
<i>N. abscessus</i>	21	DSM 44432 ^T
<i>N. cyriacigeorgica</i>	19	DSM 44484 ^T
Intermediate prevalence	55	
<i>N. wallacei</i>	16	DSM 45136 ^T
<i>N. veterana</i>	14	DSM 44445 ^T
<i>N. otitidiscaviarum</i>	13	DSM 43242 ^T
<i>N. brasiliensis</i>	11	DSM 43758 ^T
Low prevalence	40	
<i>N. beijingensis</i>	12	DSM 44636 ^T
<i>N. paucivorans</i>	11	DSM 44386 ^T
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	10	DSM 44290 ^T
<i>N. neocaledoniensis</i>	3	DSM 44717 ^T
<i>N. asteroides</i>	4	DSM 43757 ^T
Sub-total	203	
<i>N. cerradoensis</i> *	3	DSM 44546 ^T
<i>N. altamirensis</i> *	2	DSM 44997 ^T
<i>N. puris</i> *	6	DSM 44599 ^T
<i>N. goodfellowi</i> *	3	DSM 45516 ^T
<i>N. arthritis</i> *	5	DSM 44731 ^T
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

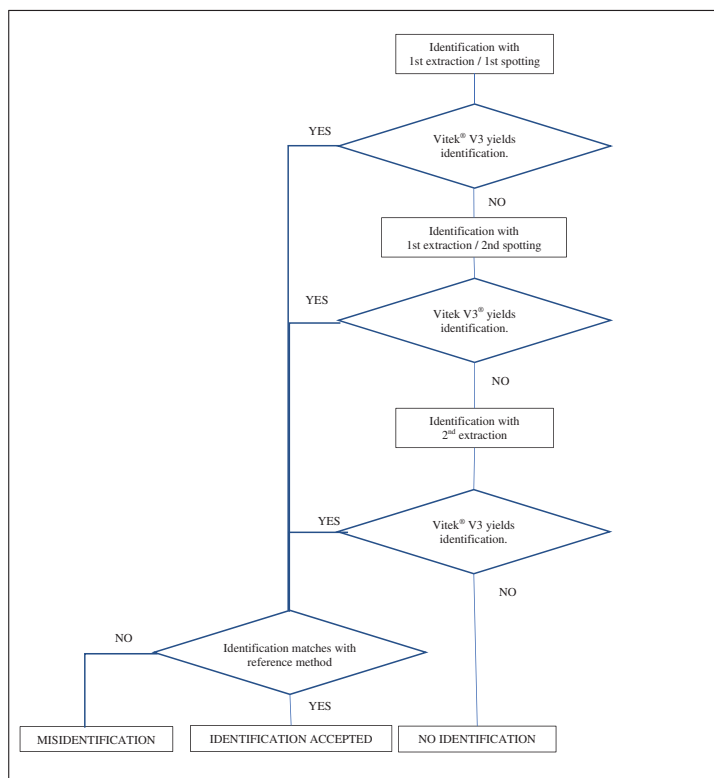
Out of 222 tested strains, 203 belonged to species present in the VITEK MS V3.0 database and were first submitted to a standard smear based identification process. The system yielded poor identification rates of 15% and 11% for BCP and COS media, respectively. The protein extraction procedure allowed 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 Y3.0 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)	No. of isolates (BCP/COS)	BCP (% attempt) (% initial)	COS (% attempt) (% initial)	BCP (% 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) ¹	23 (88) ¹		
<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. cytaeigeorgica</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) ²		
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)		

¹ *N. nova* was identified using slash line *N. nova*/*N. africana*

² 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. cerradoensis*, *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. cerradoensis* 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. cerradoensis*, *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. cerradoensis* 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 ¹	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 oryzihabitans</i>	Correct Id
<i>N. asteroides</i>	4	<i>N. neocaledoniensis</i>	Correct Id
			(complex: <i>N. asteroides/N. neocaledoniensis</i>)
<i>N. asteroides</i>		<i>N. neocaledoniensis</i>	<i>N. neocaledoniensis</i>
<i>N. arthritis*</i>	5	<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. arthritis*</i>		<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. arthritis*</i>		<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. arthritis*</i>		<i>N. beijingensis</i>	No Id
<i>N. arthritis^{T*}</i>		<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^{T*}</i>		<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^{T*}</i>		<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>

¹ 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. arthritis* ([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, Djiguiba K, Moal V, Legris T, Purgus R, Bismuth J, Elharrar X, Reynaud-Gaubert M, Vacher-Coonat 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, Gurguí 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, 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>
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 estest. *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 corrélérer 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 1.0×10^3 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 Civiles 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'identification 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 (N₂O) 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^T 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^T. 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^{ème} 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 E₂M₂ (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^{ème} 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^{ème} 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^{ème} 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^{ème} 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^{er} 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^{ème} 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^{ème} 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^{ème} 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^{ème} 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^{ème} 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⁺ strains, AgTrS, AiOr and AvVan, the first sequenced *Frankia* strains able to sporulate *in-planta*

Lorine Bethencourt¹, Florian Vautrin¹, Najwa Taib², Audrey Dubost¹, Lucia Castro-Garcia², Olivier Imbaud², Danis Abrouk¹, Pascale Fournier¹, Jérôme Briolay³, Agnès Nguyen⁴, Philippe Normand¹, Maria P. Fernandez¹, Céline Brochier-Armanet², Aude Herrera-Belaroussi¹✉

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⁺ 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⁺ 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⁺”, have the ability to sporulate inside host

cells (unlike “Sp-” strains unable of *in-planta* sporulation) [4]. Sp⁺ 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⁺ 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⁺ 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 Na₂S₂O₃. 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).

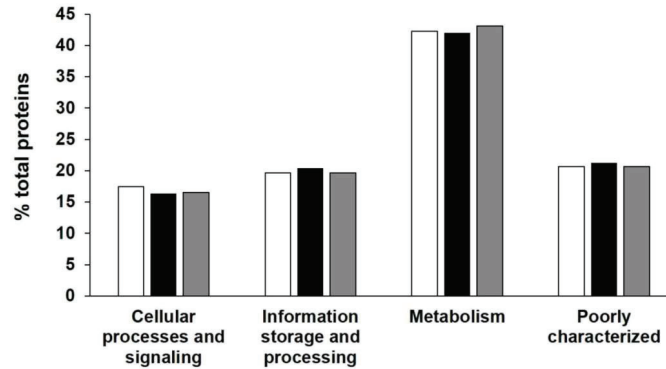


Figure 1. COG functional classification of proteins encoded on the three sequenced Sp+ *Frankia* genomes AgTrS, AiOr and AvVan. Proportions (%) of proteins in each of the COG super-functional categories "Cellular processes and signalling", "Information processing and storage", "Metabolism" and "Poorly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

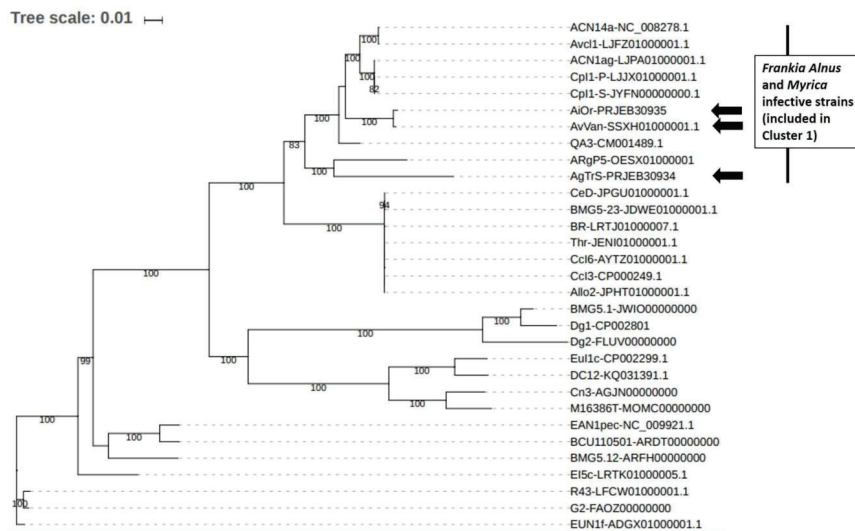


Figure 2. Position of the three Sp+ sequenced *Frankia* strains AgTrS, AiOr and AvVan in *Frankia* genus phylogeny based on ribosomal proteins. In addition to Sp+ genomes, a total of 28 sequenced *Frankia* strains were used. For all the 31 genomes, 51 ribosomal protein sequences (total size = 18,582 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 ≤ 54 %).

Sp+ strain	Data before read sorting			Data after read sorting		
	Read number	Total contig number (with ≥ 5 kb)	Mean contig size (pb)	Read number	Total contig number (with ≥ 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 ^T (ACN14a ^T)	NC_008278.1	1	7,497,934	72.8	-	-	-	<i>Alnus</i>	<i>Alnus</i> , Myricaceae	[13]
<i>F. torreyi</i>	1	DSM 44263 ^T (Cp11-5 ^T)	JYFN00000000	153	7,624,758	72.4	-	-	-	<i>Comptonia</i>	<i>Alnus</i> , Myricaceae	[19]
<i>F. canadensis</i>	1	DSM 45898 ^T (ARgP5 ^T)	OESX01000001	568	7,730,285	72.4	-	-	-	<i>Alnus</i>	<i>Alnus</i> , Myricaceae	[20]
<i>F. casuarinae</i>	1	DSM 45818 ^T (Ccl3 ^T)	CP000249.1	1	5,433,628	70.1	-	-	-	<i>Casuarina</i>	Casuarinaceae (except <i>Gymnostoma</i>)	[13]
<i>F. coriariae</i>	2	DSM 100624 ^T (BMG5.1 ^T)	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>	Rosaceae, <i>Datisca</i>	[22]
<i>Candidatus F. daticae</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 ^T (BCU110501 ^T)	ARDT00000000	207	7,891,711	72.3	-	-	-	<i>Discaria</i>	Rhamnaceae, Elaeagnaceae, <i>Gymnostoma</i>	[24]
<i>F. elaeagni</i>	3	DSM 46783 ^T (BMG5.12 ^T)	ARFH00000000	139	7,589,313	71.7	-	-	-	<i>Elaeagnus</i>	Rhamnaceae, Elaeagnaceae, <i>Gymnostoma</i>	[25]
<i>F. irregularis</i>	3	DSM 45899 ^T (G2 ^T)	FAOZ00000000	83	9,537,992	70.9	-	-	-	<i>Casuarina</i>	Rhamnaceae, Elaeagnaceae, <i>Gymnostoma</i>	[26]
<i>F. inefficax</i>	4	DSM 45817 ^T (Eu11c ^T)	CP002299.1	1	8,815,781	72.3	-	-	-	<i>Elaeagnus</i>	Elaeagnaceae, <i>Morella</i>	[8]
<i>F. saprophytica</i>	4	DSM 105290 ^T (Cn3 ^T)	AGJN00000000	2	9,978,592	71.8	-	-	-	<i>Coriaria</i>	-	[27]
<i>F. symbiotica</i>	4	DSM 100626 ^T (M16386 ^T)	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, Avc11, ACN1ag, Cp11P, Cp11S, 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, Avc11, ACN1ag, Cp11P, Cp11S, 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 SXXH00000000 (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 JF, 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, Lapierre 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 Cp11, 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 datiscae" 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, Detter 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 Y¹, Marjolet L¹, Bouchali R¹, Marti R¹, Vautrin F^{1,2}, Voisin J^{1,2}, Bourgeois E¹, Rodriguez-Nava V¹, Blaha D¹, Winiarski T², Mermillod-Blondin F², Cournoyer B¹

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 ; Vezaro & 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 métabarcoding 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.



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

3 Yannick Colin^{1‡}, Rayan Bouchali¹, Laurence Marjolet¹, Romain Marti¹, Florian Vautrin^{1,2}, Jérémy Voisin^{1,2},
4 Emilie Bourgeois¹, Veronica Rodriguez-Nava¹, Didier Blaha¹, Thierry Winiarski², Florian Mermillod-Blondin²
5 and Benoit Cournoyer¹

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

11 [‡] 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 / 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; Pignoret 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

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



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

104 2 Material and Methods

105 2.1 Experimental site

106 The Chassieu urban catchment is located in the suburbs of Lyon (France). It has a surface of 185 ha and hosts
 107 mainly industrial and commercial activities (*i.e.* wholesaling, recovery and waste management, metal surface
 108 treatment, car wash and repair services). The imperviousness coefficient of the catchment area is about 75 %.
 109 Stormwater and dry weather flows from industrial activities are drained by a network separated from the sewer.
 110 This network transfers waters into the Django-R SIS, which is part of the OTHU long term experimental
 111 observatory dedicated to urban waters (<http://www.graie.org/othu/>). This SIS contains an open and dry detention
 112 basin (DB) (32,000 m³), built on a concrete slab, with edges impermeabilized by a thick plastic lining. This DB
 113 allows a settling of coarse and medium size particles, resulting in sedimentary deposits which favor development
 114 of a plant cover. The DB water content is delivered within 24h into an infiltration basin (IB) (61,000 m³), which
 115 favors the recharge of the connected aquifer (AQ). This infiltration basin had a vadose zone of about 11 m during
 116 the experiments, and its geology, hydrology, ecology and pollution levels have been deeply investigated e. g.
 117 Barraud et al. (2002); Le Coustumer and Barraud (2007).



118 The Chassieu watershed, the Django-R SIS, and the Lyon aquifer were considered for this study (Figure 1,
 119 Table S1). Watershed runoff waters (hereafter WS) have been collected from sampling points spread over the
 120 catchment (21 sub-watersheds over three sampling periods, n=64 samples). Sediments from the detention basin
 121 (hereafter DB) have been recovered from 50 cm² area covering the full sediment column down to the concrete slab
 122 of the DB (n=20 samples). These sediments (or urban soils) often had an herbaceous plant cover, and were sampled
 123 in four areas defined according to the hydrological forces prevailing in the basin (e. g. Marti et al., 2017; Sébastien
 124 et al., 2014). Infiltration basin soil samples (hereafter IB) had been collected from 3 main zones (the area receiving
 125 the inflow waters, the bottom area of the basin, and an upper zone of the basin exposed to inflow waters only
 126 during strong rain events) (n=5 samples per zone), at a 0-10 cm depth covering a surface of 50 cm². The aquifer
 127 samples have been recovered from piezometers located upstream (up, in a zone of the aquifer not influenced by
 128 water recharge) and downstream (dw, in a zone of the aquifer influenced by water recharge) of the SIS of the
 129 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).
 130 Groundwater samplings (n=6; named AQ_wat) had been performed with an immersed pump, used at a pumping
 131 rate of 6–8 L/min (PP36 inox, SDEC, Reignac-sur-Indre, France), and previously cleaned with 70% ethanol. The
 132 first 50 L were used to rinse the sampling equipment and discarded. The following 6 L were used for the
 133 microbiological analyses. The biofilm samples (AQ_bio) from the aquifer were recovered using clay beads
 134 incubated in the aquifer over 10 days using the same piezometers as those used for the aquifer water samplings
 135 (n=6 samples). Clay beads were used as physical matrix to sample groundwater biofilms according to Voisin et al.
 136 (2016).

137 2.2 PCR products DNA sequencings

138 Sequencing of the V5-V6 16S rRNA gene (*rrs*) PCR products were performed by the MrDNA company
 139 (Shallowater, TX, USA) with Illumina MiSeq technology and using the primers set 799F-1193R. The *tpm* DNA
 140 libraries were generated using the following mix of degenerated primers: ILMN-PTCF2
 141 (GTGCCGYTRTGYGGCAAGA), ILMN-PTCR2 (ATCAKYGCGGCGGTCRTA), ILMN-PTCF2m
 142 (GTGCCYTRTGYGGCAAGT), and ILMN-PTCR2m (ATGAGBGCTGCCGTGTCRTA) as suggested by
 143 Favre-Bonté et al. (2005). PCR reactions were performed under the following conditions: (1) a hot start at 94°C
 144 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
 145 min at 72°C. The PCR products were sequenced by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France) using the Illumina MiSeq
 146 technology. The 16S rRNA and *tpm* gene sequences are available at the European Nucleotide Archive
 147 (<https://www.ebi.ac.uk/ena>).

148 2.3 Bioinformatic analyses

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



157 analyses. Operational Taxonomic Units (OTUs) were defined using a 97% identity cut-off. FAPROTAX (Louca
 158 et al., 2016) functional inferences were performed on the MACADAM Explore web site
 159 (<http://macadam.toulouse.inra.fr/>) according to Le Boulch et al. (2019). For the *tpm* gene sequences, chimeric
 160 sequences, primers, barcodes were removed, and the dataset was limited to sequences of a minimum length of 210
 161 bp (average length=215 bp). The number of sequences was then normalized between the samples (4,636 sequences
 162 per sample) and Operational Taxonomic Units (OTUs) were defined with a 100% identity cut-off. The
 163 “BD_TPM_Mar18_v1.unique_770seq” database (<http://www.graie.org/othu/donnees>) was used to classify the
 164 sequences using the “Wang” text-based Bayesian classifier (Wang et al., 2007) and a P-bootstrap value above
 165 80%. Local Blast analyses were performed on the “BD_TPM_Mar18_v1.unique_770seq” database using the
 166 NCBI BLASTX program in order to check the quality of the taxonomic affiliations.

167 2.4 Statistical analyses

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

180 2.5 Bacterial community coalescence analyses

181 The SourceTracker computer package (Knights et al., 2011) was used to investigate community coalescence.
 182 SourceTracker is a Bayesian approach built to estimate the most probable proportion of user-defined “source”
 183 OTU in a given “sink” community. In the present analysis, various scenarios of community coalescence were
 184 investigated such as the coalescence of bacterial taxa from the watershed runoff waters and sediments from the
 185 detention and infiltration basins, with those of the downstream SIS aquifer water samples or of recent biofilms
 186 developing on clay beads incubated in the aquifer. SourceTracker was run with the default parameters (rarefaction
 187 depth 1000, burn-in 100, restart 10) to identify sources explaining the OTU patterns observed among the aquifer
 188 samples (waters and clay bead biofilms, n=12). Alpha values were tuned using cross-validation (alpha 1= 0.001
 189 and alpha 2= 1). The relative standard deviation (RSD) based on three runs was used as a gauge to evaluate
 190 confidence on the computed values (Henry et al., 2016; McCarthy et al., 2017).

191 3. Results

192 3.1 16S rRNA V5-V6 gene sequences distribution biases and profilings

193 The analysis of the 16S rRNA V5-V6 gene libraries yielded 2,124,272 high-quality sequences distributed across
 194 103 samples. Subsampling-based normalization was applied (20,624 reads per sample) and sequences were



195 distributed into 10,231 16S rRNA gene OTUs at a 97 % threshold. The rarefaction curves indicated that the
 196 sequencing depth was sufficient to cover bacterial diversity (Figure S1). At all sampling sites, bacterial
 197 communities were dominated by Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria (WS=95.1% of total reads,
 198 DB=84.3%; IB=71.4%; AQ_bio=98.8% and AQ_wat=58.6%), but 10 other phyla with relative abundances
 199 superior to 0.5% were also detected (Figure 2A and Table S2). Alpha-diversity estimates showed that aquifer
 200 samples harbored a microbiome with a significantly lower richness (AQ_bio: $S_{obs}=278$ OTUs \pm 106 and AQ_wat:
 201 $S_{obs}=490$ OTUs \pm 333) and a less diverse bacterial community (AQ_bio: $H'=2.9 \pm 0.3$ and AQ_wat: $H'=4.3 \pm 0.7$)
 202 than the ones of the upper compartments ($S_{obs-WS}=1,288$ OTUs \pm 232; $S_{obs-DB}=1,566$ OTUs \pm 245, $S_{obs-IB}=1,503$
 203 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).
 204 Among the surface samples, a greater diversity was observed among the soil samples from the infiltration basin
 205 than from samples of watershed runoff waters and sediments of detention basin (ANOVA, $p<0.05$). In the aquifer,
 206 water grab samples were more diverse and showed higher 16S rRNA gene OTU contents than biofilms recovered
 207 from clay beads incubated for a 10-day period (ANOVA, $p<0.05$) (Figure 2B and Table S3).

208 The structure of bacterial communities inferred from V5-V6 16S rRNA gene sequences changed markedly
 209 along the watershed down the aquifer. A PCoA ordination of the OTU profiles based on weighted Unifrac distances
 210 revealed that samples clustered according to their compartment of origin (*i.e.* WS, DB, IB, AQ_bio and AQ_wat)
 211 (Figure 3). These changes in community structures between compartments were supported by PERMANOVA
 212 statistical tests ($F=20.7$, $P<0.001$). Bacterial communities per compartment were found to be made of core and
 213 flexible (defined as not conserved between all sampling periods) bacterial taxa. Within a same compartment,
 214 similarities between bacterial community profiles ranged from 64.9% (AQ_wat) to 82.0% (IB), while similarities
 215 across compartments ranged from 47.8% (DB vs AQ_bio) to 65.9% (DB vs IB) (Figure S2). Bacterial community
 216 profiles of the aquifer waters were found closer to the ones of the detention basin deposits (57.5%) and soils of the
 217 infiltration basin (61.4%) than those of the aquifer biofilms (47.8 and 49.2%, respectively). However, more than
 218 89% of the 16S rRNA gene OTUs ($n=8,284$) identified above the aquifer (WS, DB and IB) were not detected in
 219 groundwater samples (AQ_bio and AQ_wat) (Figure S3). This large group of OTUs was made of minor taxa which
 220 accounted for 37.1%, 44.3% and 47.3% of the total reads recovered from the WS, DB and IB samples, respectively.

221 3.2 Coalescence of surface and aquifer bacterial communities

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



235 (64%) and the aquifer waters (30%). This was not considered surprising because runoff infiltration can occur in
 236 several sites upstream of the SIS (even though no direct relation with other SIS were made).

237 3.3. 16S rRNA gene inferred bacterial taxa undergoing coalescence in the aquifer

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

252 Regarding the bacterial taxa of the aboveground communities matching those of the aquifer samples, a total of
 253 1,021 16S rRNA gene OTUs was found to be shared between these compartments (Table 1 and Figure S3). These
 254 OTUs consisted of abundant taxa as they accounted for 9.7-39.4% of the total reads for the samples recovered
 255 from the surface compartments, and for 33.6-83.4% and 95.0-99.4% of the total reads of the water and biofilm
 256 aquifer samples, respectively. The β - and γ -proteobacteria dominated this group. It is noteworthy that aquifer
 257 samples collected upstream of the SIS shared less OTUs with the surface compartments (125 OTUs \pm 41) than
 258 samples under the influence of the infiltration system (332 OTUs \pm 85) (Table 1). The shared OTUs between
 259 aquifer samples and the upper compartments represented a higher fraction of bacterial communities in samples
 260 recovered downstream the SIS (81.3% \pm 22.8 of total reads) compared to those collected upstream (68.9% \pm 30.9
 261 of total reads) (Table 1). Reads from *Pseudomonas*, *Nitrospira*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Flavobacterium* were
 262 the most abundant (>1%) of the shared OTUs recovered in the aquifer water samples, while those allocated to
 263 *Pseudomonas*, *Duganella*, *Massilia*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Aquabacterium*, *Novosphingobium*,
 264 *Sphingobium*, *Perluclidibaca*, *Meganema* were the most abundant (>1%) among the aquifer biofilms (Table S4).
 265 Most of these aquifer water taxa (except *Streptococcus*) were found involved in denitrification or nitrification as
 266 inferred from FAPROTAX. The biofilm taxa were more often associated with hydrocarbon degradation
 267 (*Novosphingobium*, *Sphingobium*, and *Nocardia*) by FAPROTAX. Several of these biofilm bacterial genera were
 268 also found to be likely containing potential human pathogens (*Duganella*, *Massilia*, *Nocardia*, and *Aquabacterium*)
 269 by FAPROTAX (and published clinical records). A set of 14 potentially hazardous bacterial genera was selected
 270 from Table S4, and used to illustrate the coalescence of bacterial taxa among the aquifer samples on Fig. 4. The
 271 16S rRNA gene reads from *Flavobacterium* prevailed in all upper compartments (WS=6.9% of total reads,
 272 DB=13.4% and IB=8.3%) and were in significant numbers among the connected aquifer (AQ_wat = 1.1% and
 273 AQ_bio = 3.1%) (Figure 4B and Table S4C). *Pseudomonas* 16S rRNA gene reads were in relatively lower numbers



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

279 3.4 Coalescence of *Pseudomonas* and other *tpm*-harboring bacterial species

280 DNA sequences from *tpm* PCR products generated according to Favre-Bonté et al. (2005) allowed a deeper
 281 analysis of the bacterial species undergoing a coalescence with the aquifer microbiome. A total of 19,129 *tpm*
 282 OTUs was identified among the samples (from datasets re-sampled to reach 4,636 reads per sample). As expected,
 283 these *tpm* reads were mainly assigned to the *Proteobacteria* (WS = 91.7% of total reads, DB = 86.5% ; IB = 76.3%
 284 ; AQ_wat = 82.9% and AQ_wat = 85.0%), but some reads could also be attributed to the *Bacteroidetes*, *Nitrospirae*
 285 and *Cyanobacteria* (Table S5). These taxonomic allocations allowed the identification of 24 bacterial genera and
 286 91 species whose distributions are summarized in Tables S6 and S7. The *tpm* sequences were mainly allocated to
 287 the *Pseudomonas* (WS = 35.5% of total reads, DB = 27.2% ; IB = 7.3% ; AQ_wat = 51.4% and AQ_bio = 47.6%),
 288 *Aeromonas* (WS = 0.8% of total reads, DB = 2.7% ; IB < 0.05% ; AQ_wat = 0.07% and AQ_bio < 0.05%),
 289 *Xanthomonas* (WS = 4.4% of total reads, DB < 0.05% ; IB = 1.3% ; AQ_wat = 8.3% and AQ_bio < 0.05%),
 290 *Herbaspirillum* (WS = 10.74% of total reads) and *Nitrosomonas* (DB = 4.4% of total reads ; IB = 0.23%) (Table
 291 S6). Reads related to *Pseudomonas* were allocated to 50 species, including pollutant-degraders (*P.*
 292 *pseudoalcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. alcaligenes*, *P. putida* and *P. fluorescens*), phytopathogens (*P.*
 293 *syringae*, *P. viridiflava*, *P. stutzeri*, and *P. marginalis*) and human opportunistic pathogens (*P. aeruginosa*, *P.*
 294 *putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *S. acidaminiphila*) (Table S7). Reads related to the *Aeromonas* were attributed
 295 to 11 species but only reads allocated to *A. caviae* could be recovered from the aquifer and aboveground
 296 compartments (Table S7). Reads related to the *Xanthomonas* were allocated to 9 species but only those allocated
 297 to the *X. axonopodis/campestris* complex and *X. cannabis* species were recovered from the aquifer and upper
 298 compartments (Table S7). Regarding the *Pseudomonas*, *tpm* reads allocated to *P. jessenii*, *P. chlororaphis*, and *P.*
 299 *resinovorans* were restricted to the aquifer samples. Reads allocated to *P. aeruginosa*, *P. anguilliseptica*, *P.*
 300 *chengduensis*, *P. extremaustralis*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. gessardii*, *P. koreensis*, *P. pseudoalcaligenes*, *P.*
 301 *putida*, *P. stutzeri*, *P. umsongensis*, and *P. viridiflava*, were recovered from the aquifer and upper compartments
 302 (Table S7). FAPROTAX analysis indicated that a significant number of the species detected in the aquifer can be
 303 involved in denitrification (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *S. acidaminiphila*, *X.*
 304 *autotrophicus*, *P. chlororaphis*) or nitrification (*Nitrospira defluvii*, *Nitrosomonas oligotropha*) but also in
 305 hydrocarbon degradation (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*). Some were also suggested by FAPROTAX to
 306 be human pathogens or invertebrate parasites (e. g. *P. chlororaphis*). These functional inferences were in line with
 307 those obtained with the 16S rRNA gene dataset.

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



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

318 4. Discussion

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

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

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



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 β - and γ -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.



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

445

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

450

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

452

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

456

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

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



458 *Acknowledgments.* This work was partly funded by l'Agence Nationale de la Recherche through the ANR-16-
 459 CE32-0006 (FROG) and ANR-17-CE04-0010 (Infiltron) projects, by Labex IMU (Intelligence des Mondes
 460 Urbains), the Greater-Lyon Urban Community, the French national research program for environmental and
 461 occupational health of ANSES under the terms of project "Iouqmer" EST 2016/1/120, the School of Integrated
 462 Watershed Sciences H2O'LYON (ANR 17-EURE-0018), "Investissements d'avenir" program), the MITI CNRS
 463 project named Urbamic, and the Urban School of Lyon (ANR-17-CONV-0004). Authors thank the OTHU network
 464 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 β -
 478 lactamases, encoded by a transferable plasmid. *J. Antimicrob. Chemother.*, 71, 272–274, [https://doi:](https://doi.org/10.1093/jac/dkv304)
 479 [10.1093/jac/dkv304](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: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01050.x](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:10.2134/jeq2015.02.0067](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 Igbinsa, 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 umsongensis* 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/ijs.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., Tarasewicz, 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.

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



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	rsd	mean	rsd	rsd	mean	rsd	rsd	mean	rsd	rsd	mean	rsd	rsd
AQ_wat_dw1	22.82%	9.67	94.37	0.02%	10.71	10.71	3.83%	10.71	10.71	0.02%	96.25	73.31%	2.49	2.49	2.49
AQ_wat_dw2	58.94%	6.03	10.74	6.26%	10.74	20.32	1.27%	20.32	20.32	12.64%	21.27	20.89%	20.27	20.27	20.27
AQ_wat_dw3	25.49%	7.06	10.47	9.07%	10.47	24.58	0.81%	24.58	24.58	3.83%	31.01	60.81%	2.06	2.06	2.06
AQ_bio_dw1	24.04%	13.55	8.47	19.95%	8.47	107.45	0.17%	107.45	107.45	46.37%	4.71	9.14%	4.72	4.72	4.72
AQ_bio_dw2	29.44%	18.54	9.91	17.28%	9.91	94.43	0.16%	94.43	94.43	44.71%	7.05	8.40%	6.77	6.77	6.77
AQ_bio_dw3	44.66%	8.39	15.6	22.22%	15.6	105.66	0.37%	105.66	105.66	25.90%	4.21	6.84%	13.55	13.55	13.55
AQ_bio_up1	51.18%	0.98								46.35%	1.14	2.47%	1.12	1.12	1.12
AQ_bio_up2	81.11%	0.23								10.93%	4.68	7.95%	4.19	4.19	4.19
AQ_bio_up3	60.31%	0.74								32.30%	1.32	7.39%	4.31	4.31	4.31

* 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.

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



681

Table 3. Relative distribution of *ipm* reads per OTU (mean ± sd) shared between the upper compartments and the aquifer, and that were allocated to well-defined species.¹

Genus	Species	OTU code ²	WS	DB	IB	AQ_Wat_up	AQ_Bio_up	AQ_Wat_dw	AQ_Bio_dw
<i>Nitrosomonas</i>	<i>oligotrophia</i>	Otn00035	nd	1.5 ± 3.40	0.15 ± 0.30	nd	+	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	Otn00066	0.42 ± 1.13	nd	+	nd	nd	nd	0.17 ± 0.30
<i>Pseudomonas</i>	<i>chengduensis</i>	Otn00024	nd	+	+	20.45 ± 35.39	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>extremanustralis</i>	Otn04178	nd	+	nd	nd	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>fregi</i>	Otn00197	0.61 ± 4.05	nd	nd	nd	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>pseudobacilligenes</i>	Otn00197	0.07 ± 0.38	+	nd	+	nd	nd	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	Otn00800	+	+	nd	nd	nd	+	nd
<i>Pseudomonas</i>	<i>stutzeri</i>	Otn00119 & Otn10066	0.06 ± 0.33	nd	+	3.06 ± 5.29	nd	nd	+
<i>Pseudomonas</i>	<i>umsongensis</i>	Otn00005	+	+	nd	0.41 ± 0.71	17.79 ± 20.11	5.34 ± 8.58	11.71 ± 13.17
<i>Pseudomonas</i>	<i>viridiflava</i>	Otn00204	0.06 ± 0.31	nd	0.3 ± 1.09	nd	nd	0.07 ± 0.12	nd
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>acidaminiphila</i>	Otn00072 & Otn01119	0.09 ± 0.42	0.29 ± 0.91	0.06 ± 0.22	nd	nd	+	nd
<i>Xanthobacter</i>	<i>autotrophicus</i>	Otn00501	+	+	nd	nd	nd	0.06 ± 0.11	+
<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis/campetris</i>	Otn00019 & Otn00878	0.25 ± 0.75	nd	1.24 ± 2.07	16.04 ± 27.78	nd	nd	+
<i>Xanthomonas</i>	<i>camnabis</i>	Otn00004	3.74 ± 9.47	nd	nd	nd	+	+	+

¹ All reads from *ipm* OTUs shared between the upper compartments and the aquifer were used to compute the relative abundances.

² *ipm* 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 km² 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.

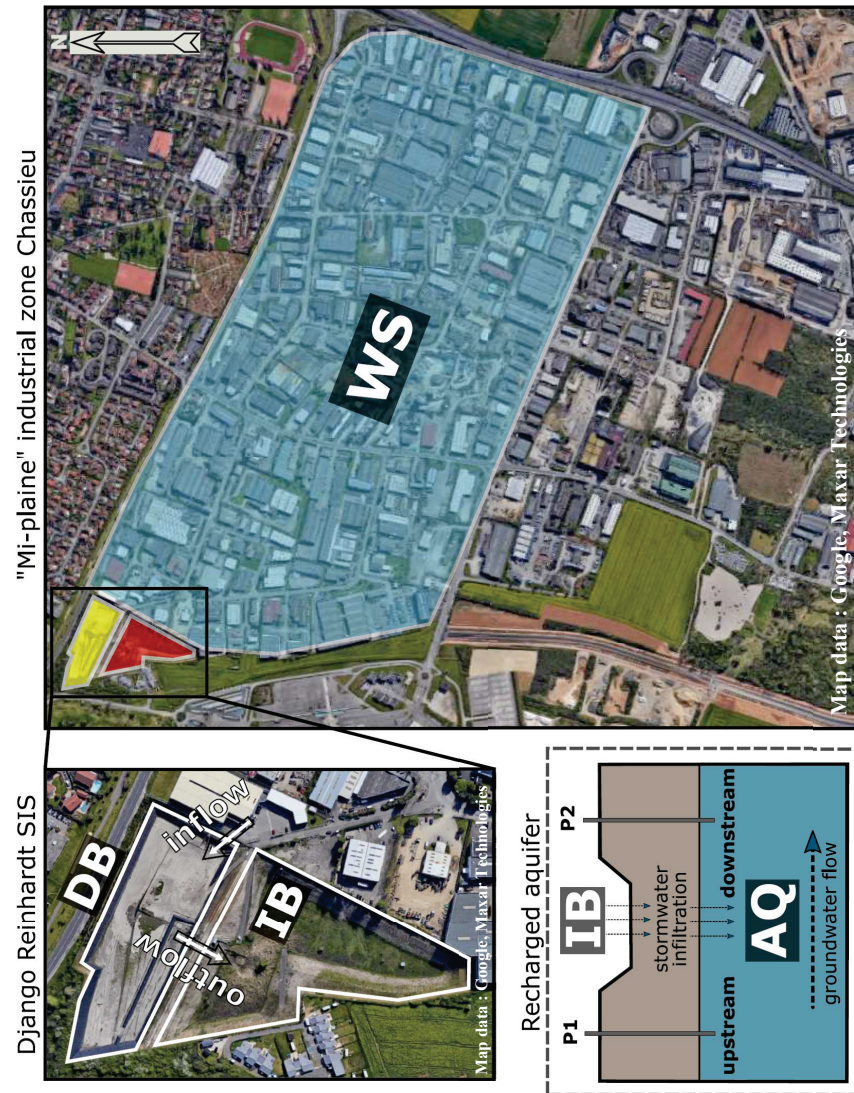
706

707

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



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



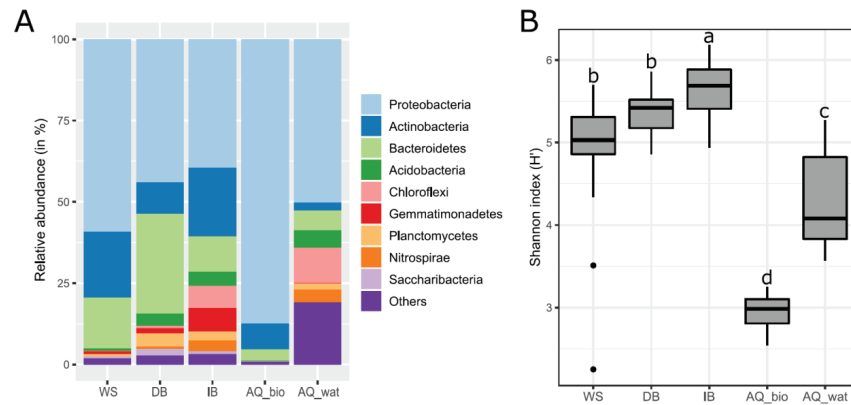
709
 710
 711
 712

<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

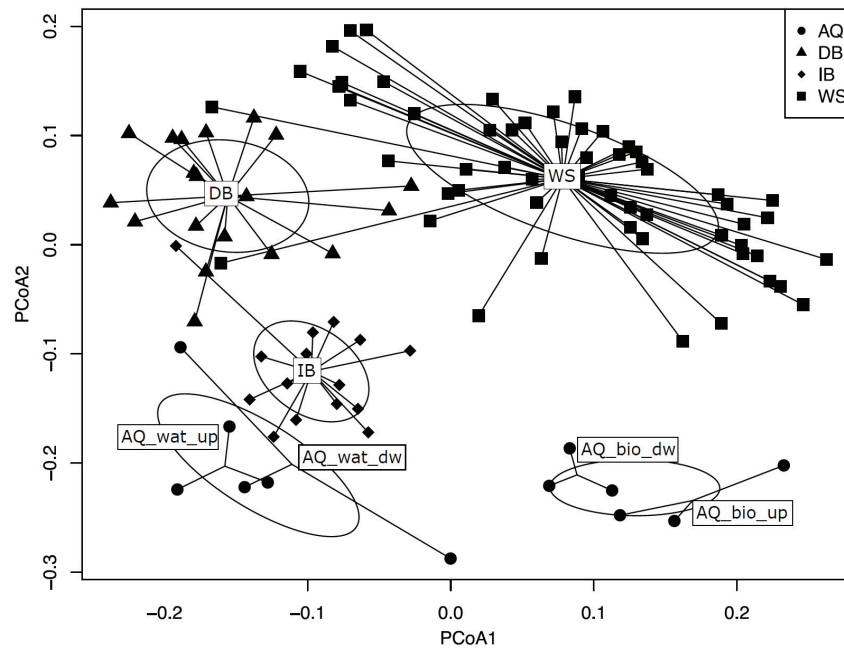
716

717

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



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



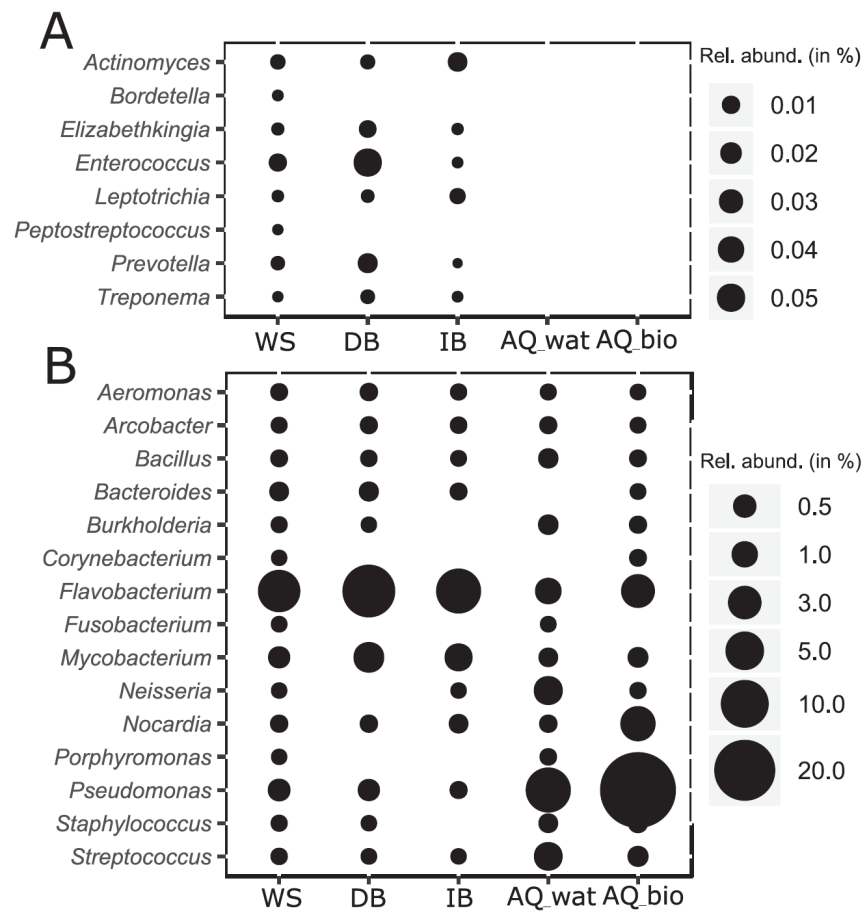
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733

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



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

735



736

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 mean (%RSD)	DB mean (%RSD)	IB mean (%RSD)	Others 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%)	
Downstream	waters	AQ_wat_dw1	NS	NS	12.67% (12.06%)	87.00% (1.99%)		
		AQ_wat_dw2	8.67% (29.04%)	9.67% (21.53%)	4.33% (13.32%)	77.33% (1.49%)		
		AQ_wat_dw3	46.67% (31%)	20.00% (82.61%)	2.33% (49.49%)	31.00% (8.53%)		
	biofilms	AQ_bio_dw1	58.67% (26.09%)	31.67% (42.41%)	1.00% (0%)	9.00% (19.25%)		
		AQ_bio_dw2	60.00% (23.51%)	30.00% (45.83%)	1.00% (0%)	9.67% (5.97%)		
		AQ_bio_dw3	51.67% (34.1%)	41.33% (39.78%)	1.00% (0%)	6.33% (32.87%)		

*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 ± sd) shared between the upper compartments and the aquifer, and that were allocated to well-defined species¹

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

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

² *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_wat: 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 métaxogénomiques 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.

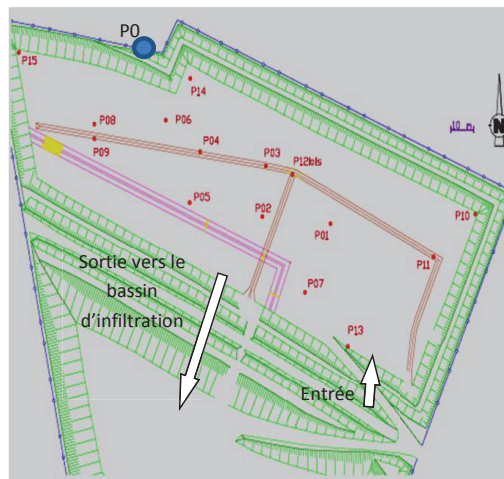


Figure 17 Zones de prélèvement des dépôts du bassin de retenue. Une zone de 40 cm² a été prélevée jusqu'au niveau de la dalle de béton ; les anthroposols des points P0, P1, P2, P4, P7, et P12 (fosse de décantation) ont été analysés par méta-taxogénomique « *rrs* » et « *tpm* ». Des pièges à particules 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.

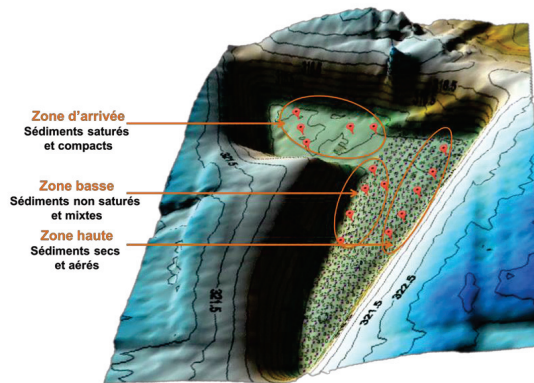


Figure 18: ZONES et points de prélèvements des sédiments du bassin d'infiltration de Django-Reinhardt.

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).

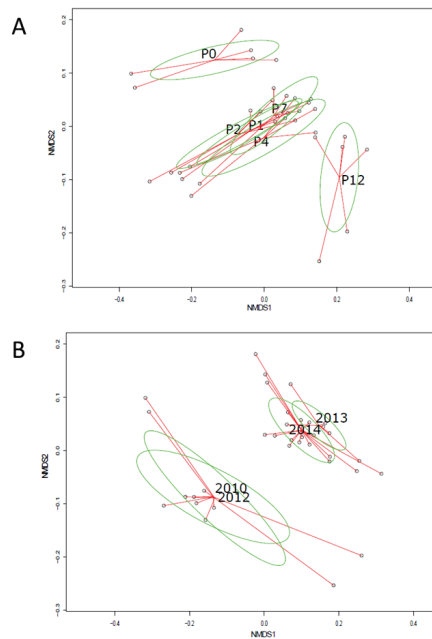


Figure 19 : Ordination NMDS des dissimilarités Bray-Curtis déduites du tableau de contingence des OTU par point d'échantillonnage (P0, P1, P2, P4, P7 and P12) et en fonction du temps. Valeur du stress test = 0.08. Les traits rouges relient les points en fonction (a) du site, et (b) de l'année. L'ellipse 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. brasicearum*, 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.

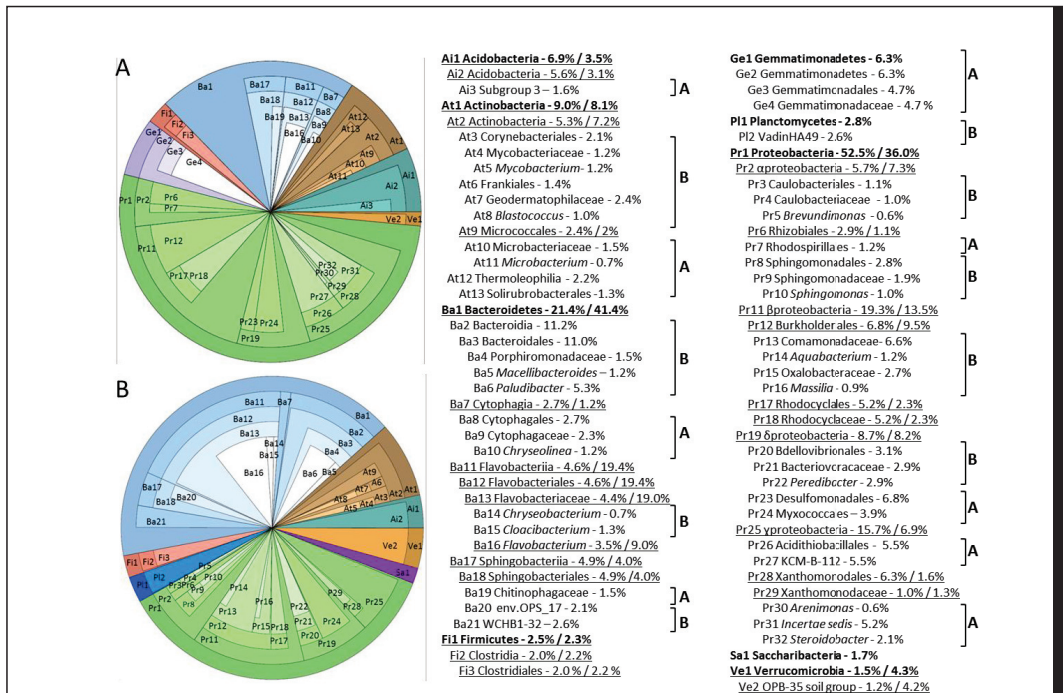


Figure 20 : Core bactériome inféré pour les périodes (a) 2010/2012, et (b) 2013/2014. Seuls les taxa représentant > 1% des OTU au niveau famille, et > 0.5% au niveau genre sont présentés. Les phyla sont indiqués en gras. Les groupes soulignés sont communs aux deux groupes. Les % indiquent l'abondance relative des taxons.

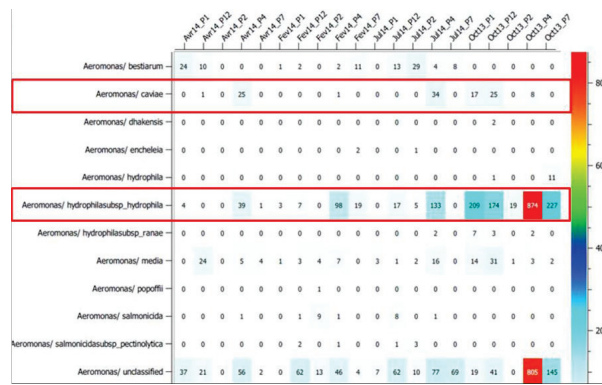


Figure 21 : Classification des séquences d'amplicons PCR tpm au sein des *Aeromonas* qui ont été obtenus d'ADN extraits du BR Django-R. Les nombres de reads sont indiqués par prélèvement. Les reads « unclassified » représentent un groupe hétérogène avec des allocations taxonomiques au sein de plusieurs espèces non-décrites à ce jour chez les *Aeromonas*.

Dynamiques spatio-temporelles BR

Cette partie repose sur six campagnes de prélèvements qui ont été réalisées entre 2013 et 2015. Durant ces campagnes, des sédiments du bassin ont été collectés en 5 points (Figure 22). Les variations en concentration des bactéries cultivables sélectionnées dans la section précédente (*Escherichia coli*, entérocoques, genre

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*.

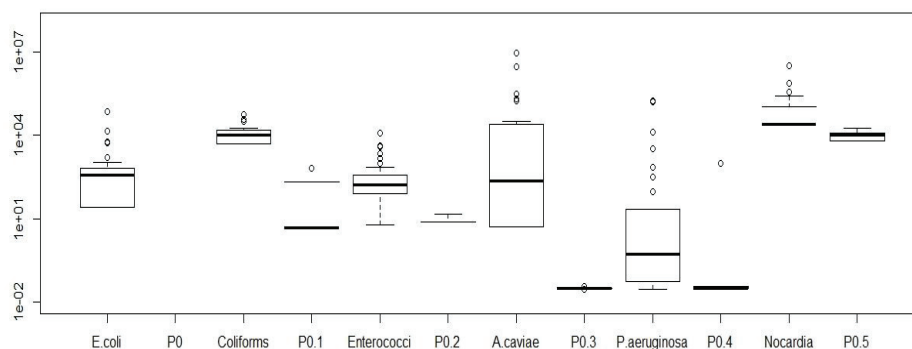


Figure 22 Boxplot des dénombrements bactériens (UFC par g. de matière sèche) pour les 5 points de prélèvements du BR Django-R, les six campagnes, et le témoin P0 (contrôle). Voir Fig. 1 pour les positions dans le BR.

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).²⁹

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 -

²⁹ 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

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.*, 1997³⁰). Les coliformes sont à la concentration de 10^4 - 10^6 UFC/g de matière sèche dans les boues d'épuration (Edmonds, 1976³¹). 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)³² 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 métaxogénomique 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 $1,7 \cdot 10^3$ 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

³⁰ Flahaut *et al.*, 1997. Canadian Journal of Microbiology. 43(8):699-708.

³¹ Edmonds, 1976. Applied Environmental Microbiology. 32(4):537-46.

³² 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)³³ 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⁻¹). 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.

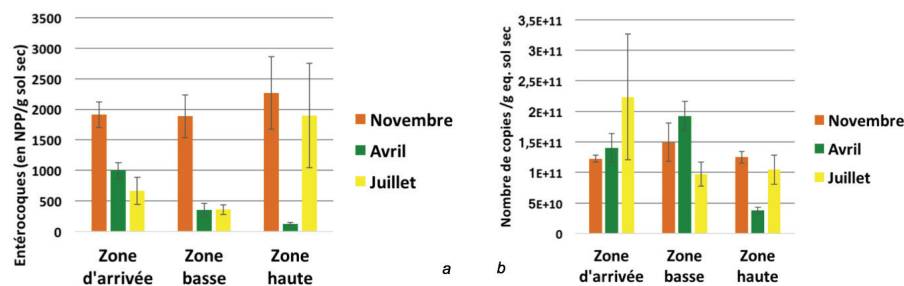


Figure 23 : Dénombrements (a) des entérocoques intestinaux (méthode culturale) et (b) des bactéries totales (PCRq ciblant le gène *rrs*) dans les anthroposols du BI Django-Reinhardt en fonction des zones de la Figure 17.

³³ 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.

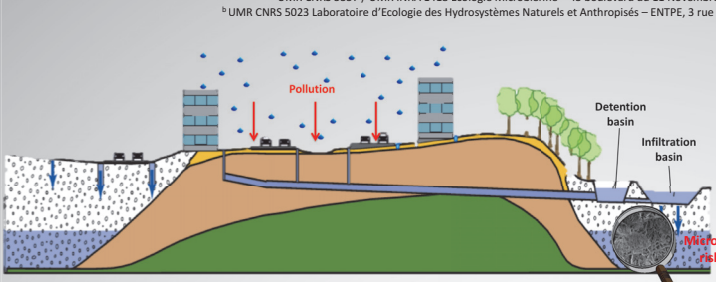
Des genres pouvant inclure des formes pathogènes ont été référencés : Mycobactéries > *Pseudomonas* > *Acinetobacter* > *Aeromonas* > *Nocardia* > *Enterococcus* > *Escherichia* > *Staphylococcus* > *Streptococcus*. Les marqueurs tpm et hsp65 ont été développés pour approfondir les niveaux de classification 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.

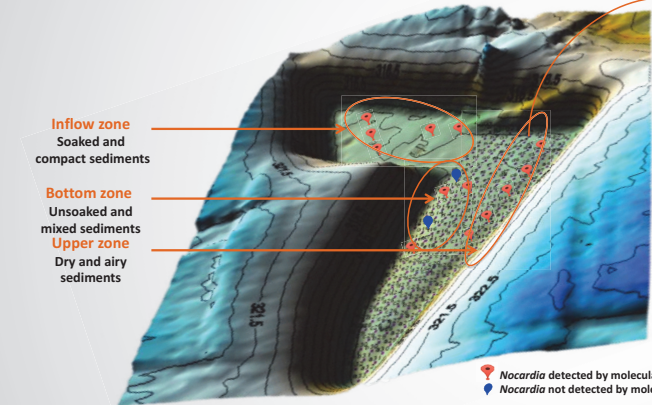



Biodiversity of *Nocardia*, an opportunistic pathogen in the water cycle

Florian VAUTRIN^a, Anaïs LE FLOCH^a, Eva GUTBRAUT^a, Emmanuelle BERGERON^a, Delphine MOUNIEE^a, Laurence MARIOLET^a, Audrey DUBOST^a, Jonathan GERVAIX^a, Benoit COURNOYER^a, Thierry WINIARSKI^b, Verónica RODRIGUEZ-NAVA^a
^aUMR CNRS 5557 / UMR INRA 1418 Ecologie Microbienne – 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex
^bUMR CNRS 5023 Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés – ENTPE, 3 rue Maurice Audin, 69518 Vaulx-en-Velin Cedex



Rising urbanization waterproofs cities. To avoid flooding, many infrastructures have been set up to manage storm water runoff, infiltration basin being one of them. Rainwater loads on dust and pollutants during its passage in the atmosphere and on the ground. Part of these particles rich in pollutants such as PAH, PCB, pesticides, etc. may end up on the surface of an infiltration basin to form the so-called "urban sediments". This represents a new ecological niche for microorganisms, such as *Nocardia*, which are able to degrade these compounds and use it as carbon or nitrogen sources for its growth.

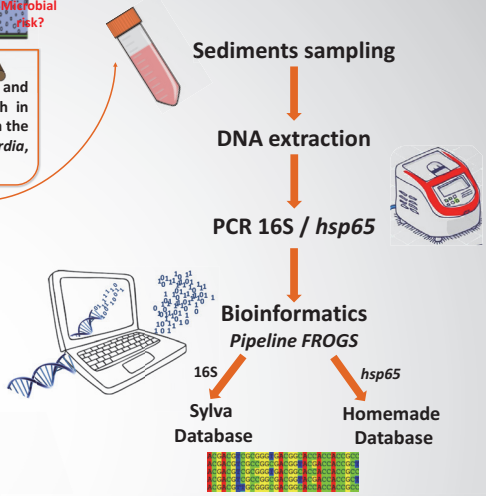


● *Nocardia* detected by molecular biology
● *Nocardia* not detected by molecular biology

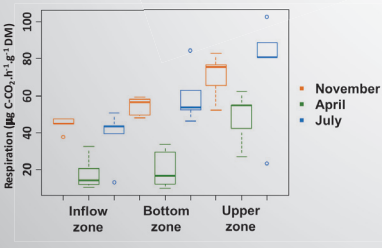
OBJECTIVES

Influence of pollution on total bacterial communities VS actinobacteria

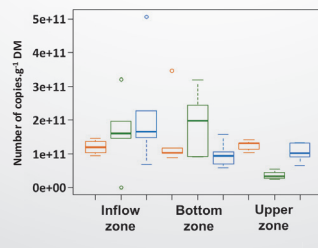
Develop a new metabarcoding target for actinobacteria



Topography of the Django-Reinhardt's infiltration basin and sampled zones

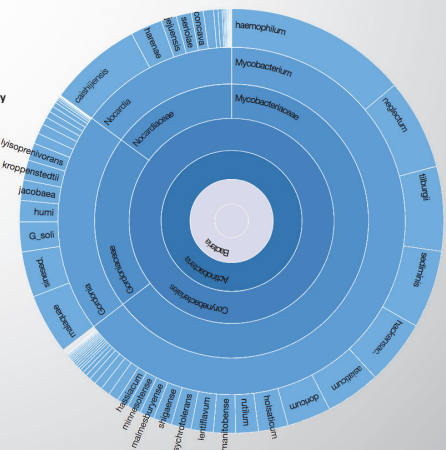


Potential activity (respiration)

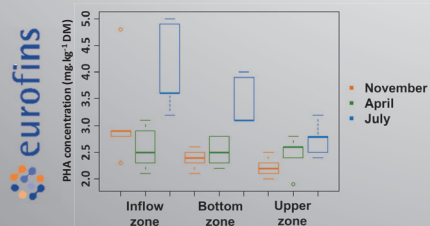


16S rRNA gene quantification

Total microbial community



Global distribution among the Actinobacteria clade




Amount of the 15 most worrying PHA

CONCLUSIONS and PERSPECTIVES

- Pollution could affect microbial activity
- Metabarcoding with *hsp65* target allows a good resolution for the actinobacteria clade
- Biological risk / pathogen infiltration

Acknowledgments
^a Florian VAUTRIN held a doctoral fellowship from la Région Auvergne-Rhône-Alpes The AME platform of the Microbial Ecology Laboratory (UMR CNRS 5557)



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/ijs.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/ijvs.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 ¹³C-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, Arzac 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^{ème} 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.

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 Mdl, 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.
- 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, Mounié 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 japonicas* 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 (*Psittirichas 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 cummidelens* 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, Gono 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, Sheikhy 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 NH_4HCO_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; <https://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^{ème} 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 spelunca* 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, Maksierekul 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/ijms.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/ijms.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/ijms.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/ijms.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/ijms.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.

