

N° d'ordre :

Année 2008

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE SAVOIE

Présentée par

Stéphanie TEXIER

Pour obtenir

Le grade de : DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE SAVOIE

Mention : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ÉCOSYSTÈMES

TITRE DE LA THÈSE :

**Dispersion et survie des populations de bactéries fécales bovines  
dans le sol des écosystèmes pâturés subalpins : conséquences sur le  
transfert bactérien dans les bassins versants**

Soutenue publiquement le :

15 Septembre 2008

COMPOSITION DU JURY

P <sup>f</sup> Fontvieille Dominique	Université de Savoie	Examineur
P <sup>f</sup> Petit Fabienne	Université de Rouen	Examineur
P <sup>f</sup> Servais Pierre	Université libre de Bruxelles	Rapporteur
D <sup>f</sup> Hartmann Alain	INRA Dijon	Rapporteur
D <sup>f</sup> Prigent-Combaret Claire	CNRS Lyon	Co-directrice de thèse
D <sup>f</sup> Trévisan Dominique	INRA Thonon-les-Bains	Co-directeur de thèse
P <sup>f</sup> Faivre Pierre	Université de Savoie	Directeur de thèse



N° d'ordre :

Année 2008

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE SAVOIE

Présentée par

Stéphanie TEXIER

Pour obtenir

Le grade de : DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE SAVOIE

Mention : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ÉCOSYSTÈMES

TITRE DE LA THÈSE :

**Dispersion et survie des populations de bactéries fécales bovines  
dans le sol des écosystèmes pâturés subalpins : conséquences sur le  
transfert bactérien dans les bassins versants**

Soutenue publiquement le :

15 Septembre 2008

COMPOSITION DU JURY

P <sup>f</sup> Fontvieille Dominique	Université de Savoie	Examineur
P <sup>f</sup> Petit Fabienne	Université de Rouen	Examineur
P <sup>f</sup> Servais Pierre	Université libre de Bruxelles	Rapporteur
D <sup>f</sup> Hartmann Alain	INRA Dijon	Rapporteur
D <sup>f</sup> Prigent-Combaret Claire	CNRS Lyon	Co-directrice de thèse
D <sup>f</sup> Trévisan Dominique	INRA Thonon-les-Bains	Co-directeur de thèse
P <sup>f</sup> Faivre Pierre	Université de Savoie	Directeur de thèse



## REMERCIEMENTS

*Me voilà arrivée au bout de cette thèse après 3 ans et demi. 3 ans et demi au cours desquels j'ai beaucoup appris, grandi autant sur le plan scientifique que sur le plan humain, années durant lesquelles j'ai également fait de grandes rencontres.*

*En premier lieu, je remercie le département EFPA de l'INRA et l'assemblée des Pays de Savoie pour avoir accepté de financer cette thèse ainsi que la mairie de Vacheresse, les exploitants de l'alpage de Bise, et le Dr Greiller, vétérinaire du troupeau de Mr et Mme Favre.*

*Merci à Jean-Marcel Dorioz pour m'accueillir au sein de la station d'hydrobiologie lacustre de l'INRA de Thonon-Les-Bains et René Bally au sein du laboratoire d'Ecologie microbienne de Lyon.*

*Une thèse n'est pas le fruit d'une seule personne mais un réel travail d'équipe. C'est pour cela que je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai collaborées durant ces années.*

*Je remercie donc mon directeur de thèse, Pierre Faivre, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible.*

*Ensuite, un grand merci à mes deux co-directeurs. Dominique Trévisan et Claire Prigent-Combaret qui m'ont accompagnée durant ces années.*

*Un grand merci à Jean-Marcel Dorioz et Yvan Möenne-Loccoz pour votre encadrement, votre recul et vos idées.*

*Merci à Philippe Quélin pour m'avoir accompagnée sur le terrain, en été comme en hiver. Vive la randonnée en raquette et les nuits en refuge en plein hiver ! J'en profite pour adresser une pensée chaleureuse à Jean-Pierre Bosse et sa famille.*

*Merci à MAP pour ton aide technique.*

*Merci à Jérôme Poulenard pour ton expertise sol et ton énergie débordante !*

*Une mention spéciale pour Marie-Hélène Gourdon avec qui j'ai partagé beaucoup d'idées, concernant ma thèse et la vie d'une façon générale.*

*Enfin, je ne pourrai jamais assez remercier Lucile Jocteur-Monrozier. Ma thèse ne serait pas ce qu'elle est sans toi ! Les générations futures d'étudiants n'auront pas la chance de te connaître, dommage pour eux...*

*Maintenant place aux stagiaires avec qui j'ai travaillé...je commencerai, dans l'ordre chronologique, par Sophie et Natasha. Mes lères expériences de terrain...mes lères galères... et deux super nanas de l'IUP Montagne pour me seconder (secourir ?). Merci les filles, j'ai passé de supers moments avec vous. Ensuite, merci à toi Lionel ! Partager les moments de terrains avec toi a été bien sympa. Et enfin, Vincent, le grand Vincent... plein de dynamisme, de gentillesse et de volonté à la paillasse.*

*3 ans et demi c'est long... beaucoup de rencontres...d'autant plus quand on travaille à deux endroits. J'espère donc ne pas oublier trop de monde...*

*Je commencerai par Thonon et mes colocataires du Château... dont certains sont devenus de vrais amis. Pour le cru 2005 : Merci à Nat et Sophie. Merci à Béren, ma 1<sup>ère</sup> camarade de chambrée, qui a survécu à mes discours nocturnes...Merci à Marilyn et Alex. J'ai passé des moments agréables en votre compagnie !*



*Pour le cru 2006, je citerai MorFatou, Mélo, une nana complètement déjantée, Lyria la star (bon courage pour la fin de ta thèse !) et Miguel. Une mention spéciale à Virginie et à ma p'tite Caro.*

*Merci à toi Chacha ! Que de bons moments et de galères partagés, de routes parcourues en voiture vers Annecy, Chambéry et Thonon ! Que de fous rires ! On a commencé nos thèses en même temps, on les finira presque en même temps aussi ! Bon courage et tout plein de bonheur et de réussite pour la suite !!!!*

*Merci aussi à Jean Guillard, Ghislaine Monet, Eric Delalex, Brigitte LeBerre, Stéphan Jacquet, Agnès Bouchez et à Manu.*

*Merci à Jérôme Lazzarotto pour m'avoir fait découvrir le Tai Chi lors des séances au bord du Lac!*

*Retour au laboratoire d'Ecologie microbienne maintenant.*

*L'UMR 5557 est un grand laboratoire, avec beaucoup de personnels et étudiants...*

*Merci à l'ensemble des membres de l'équipe rhizosphère qui ont découvert avec moi la vie trépidante d'Escherichia coli dans les bouses de vaches !*

*Merci à Franck Poly, Claire Commeaux et Eléonore Attard pour m'avoir coachée sur la DGGE.*

*Merci à Joëlle Roche pour les essais d'extractions d'ARN du sol.*

*Merci à Cath et Agnès, mes collègues du bureau 418I.*

*Un grand merci à toi Gigi !*

*Je tenais également à remercier chaleureusement les membres du groupe 6 avec lesquels et surtout lesquelles j'ai partagé, entre autre, la vie au 5<sup>ème</sup> étage et dans le labo 525... Babeth, Sylvie, Céline, Marianne, Charlotte, Cynthia et Manu.*

*Merci aux étudiants de l'équipe rhizo, Doc Jo, Mick, Martina, Oliv, Bastien...je me souviendrai pendant longtemps d'une après-midi en minibus dans le centre historique de Montpellier...*

*Merci à nos deux réunionnais Béné et Benoît, Amélie, Edwige, Amel, Céline, Joana, Lamiae, Max, Hector... et les autres.*

*Merci à Tif, Nath, Emilie, Clo, DocJo (et oui, encore lui), Manu (ben oui encore elle aussi) pour tous les moments que nous avons partagés ensemble à rollers, sur une paroi, au Syrius, en rando ou tout simplement autour d'un bon plat ou d'un bon verre... de rhum bien sûr !!!! J'espère en revivre encore beaucoup avec vous, même une fois partie du labo !*

*Je tenais à remercier mes parents, mes sœurs et mes grands-parents. Merci à Bé, Béa, Chouchou, Grand Nico, Caro et Virg. Vous avez su répondre présents et me soutenir malgré l'éloignement géographique. Merci à toi, Nico. Cette fin de thèse n'aurait pas été la même sans toi.*

*Enfin, une pensée à mes p'tits amours, Enora, Adrien et Abygaël, vous apportez bonheur et joie aux gens qui vous entourent.*



# Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique</b>	<b>7</b>
I. L'espèce <i>Escherichia coli</i> , un modèle écologique intéressant	8
I.1. <i>E. coli</i> , une bactérie commensale de l'intestin des animaux à sang chaud	8
I.2. <i>E. coli</i> , un pathogène humain	9
II. Survie d' <i>E. coli</i> dans l'environnement	12
II.1. Survie d' <i>E. coli</i> dans les matières fécales (bouses et différents effluents d'élevage)	13
II.2. Survie d' <i>E. coli</i> sur les végétaux	14
II.3. Survie dans l'eau	16
II.4. Survie dans les sols	17
II.4.1. Modalités de transfert d' <i>E. coli</i> vers le sol	18
II.4.2. Contrôle abiotique de la survie d' <i>E. coli</i>	19
II.4.2.i. Contenu en eau, humidité et oxygène	20
II.4.2.ii. Température	20
II.4.2.iii. pH	21
II.4.2.iv. Matière organique	21
II.4.2.v. Nature du sol	23
II.4.3. Facteurs de contrôle biotiques de la survie d' <i>E. coli</i>	25
II.4.3.i. Compétition et antagonisme avec la microflore tellurique	25
II.4.3.ii. La prédation	26
II.4.3.iii. Les protozoaires, réservoir de pathogènes ?	27
II.4.3.iv. Le parasitisme	27
III. Etat physiologique d' <i>E. coli</i> dans l'environnement	28
III.1. Croissance bactérienne <i>in vitro</i> et phase stationnaire	28
III.2. Mécanismes de survie des bactéries dans l'environnement	30
III.2.1. L'état viable mais non cultivable	30
III.2.2. La vie en biofilm	33
III.2.3. Les cellules persistantes	33
III.2.4. Les marqueurs génétiques de l'état physiologique des <i>E. coli</i> dans l'environnement	35
III.2.4.i. Marqueurs de division et de phase exponentielle de croissance	35
III.2.4.i.1. RpoZ, la sous-unité $\omega$ de l'ARN polymérase	35
III.2.4.i.2. Fis, une protéine de liaison à l'ADN	36
III.2.4.i.3. FtsZ, responsable de la formation de l'anneau de septation	36
III.2.4.ii. Marqueurs de phase stationnaire	37
III.2.4.ii.1. RpoS, le facteur $\sigma^s$	37
III.2.4.ii.2. Rmf, responsable de la dimérisation des ribosomes	38
III.2.4.ii.3. Dps, une protéine de liaison à l'ADN	39
IV. Diversité génétique des populations d' <i>E. coli</i>	40
IV.1. Relations phylogénétiques infraspécifiques chez <i>E. coli</i>	40



IV.2.	Diversité naturelle des populations d' <i>E. coli</i> dans l'environnement	42
IV.3.	Analyse de la diversité des populations naturelles d' <i>E. coli</i> basée sur l'utilisation du polymorphisme du gène <i>uidA</i>	44
IV.3.1.	Le gène <i>uidA</i>	44
IV.3.2.	Études de la diversité des populations d' <i>E. coli</i>	45
<b>Hypothèses de travail et démarche expérimentale</b>		<b>47</b>
<b>Chapitre 1 : L'alpage de Bise</b>		<b>51</b>
I.	Une unité pastorale remarquable	52
II.	Un alpage, un agro-écosystème (d'après Dorioz, 1998)	53
III.	Le bassin versant de l'alpage de Bise	55
III.1.	Généralités	55
III.2.	Caractéristiques géomorphologiques	55
III.3.	Contexte agropastoral	56
III.4.	Relations sol-végétation	57
III.5.	Quelques données sur l'hydrodynamique des stations pastorales retenues	59
III.5.1.	La station <i>Poa</i>	59
III.5.2.	La station <i>Rumex</i>	60
III.5.3.	La station <i>Caltha</i>	60
III.5.4.	La station <i>Nardus</i>	60
IV.	Dynamique d' <i>E. coli</i> dans l'eau de surface à l'exutoire du bassin versant	61
<b>Chapitre 2 : Les effectifs bactériens dans les bouses et les différents sols du bassin versant de l'alpage de Bise</b>		<b>62</b>
I.	Persistence of culturable <i>Escherichia coli</i> contaminants in dairy alpine grassland soils (Texier <i>et al.</i> , JEQ, accepté)	65
I.1.	Abstract	65
I.2.	Introduction	65
I.3.	Material and Methods	68
I.3.1.	Site description	68
I.3.2.	Pasture units	68
I.3.3.	Sampling of soil and cow pats	69
I.3.4.	Synchronic assessment	69
I.3.5.	Diachronic assessment	69
I.3.6.	Bacterial enumerations	70
I.3.7.	Phylogenetic relationships between partial <i>uidA</i> sequences recovered from cow pat and soil total DNA	71
I.3.8.	Statistical analyses	72
I.4.	Results	72
I.4.1.	Inputs of fecal bacteria and survival within individual cow pats	72



I.4.2.	Persistence of culturable <i>E. coli</i> in topsoil layers of different pasture units (synchronic assessment)	73
I.4.3.	Transfer and persistence of culturable <i>E. coli</i> in subsoil layers of different pasture units in two successive years (diachronic assessment)	73
I.4.4.	Diversity of <i>E. coli</i> populations from cow pats and soils	75
I.5.	Discussion	75
I.5.1.	Cow pats, a significant source of fecal <i>E. coli</i>	75
I.5.2.	<i>E. coli</i> persists in steady numbers in the topsoil of dairy alpine grasslands	76
I.5.3.	Potential transfer and subsequent persistence of <i>E. coli</i> in deeper soil layer vary according to soil conditions	77
I.5.4.	The soil as an <i>E. coli</i> reservoir: conclusion and implications	78
I.6.	Acknowledgments	79
I.7.	References	79
II.	Survie des <i>Pseudomonas</i> fluorescents dans les bouses et les différents sols du bassin versant.	85
II.1.	Travail préalable sur l'alpage réalisé en 2004	85
II.2.	Des stocks surprenants dans les bouses	85
II.3.	Evolution des stocks dans les différentes rhizosphères au cours de l'année 2006	86
II.4.	Evolution des stocks dans les différents compartiments des stations au cours de la saison de pâturage.	87
III.	Interactions <i>E. coli</i> vs. <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents dans les sols de l'alpage ?	88
<b>Chapitre 3 : Capacités d'adaptation d'<i>E. coli</i> au sol</b>		<b>89</b>
I.	Introduction	91
II.	Matériels et méthodes	93
II.1.	Inoculation en milieu nutritif liquide riche	93
II.2.	Inoculations en microcosmes de sol	93
II.2.1.	Origine des souches	93
II.2.2.	Inoculation des microcosmes de sol	94
II.3.	Extraction des ARNs et rétrotranscription	95
II.3.1.	A partir des cultures bactériennes en milieu liquide	95
II.3.2.	A partir des microcosmes de sol	95
II.4.	Marqueurs moléculaires de l'état physiologique	96
II.4.1.	Analyses phylogénétiques	96
II.4.2.	Dessin des amorces et test de spécificité	97
III.	Résultats	98
III.1.	Cinétiques de croissance d' <i>E. coli</i> en milieu liquide et dans du sol	98
III.2.	Etude moléculaire des marqueurs de l'état physiologique	99
III.2.1.	Etude phylogénétique	99
III.2.2.	Dessin des amorces et contrôle de leur spécificité	100
III.2.3.	Expression des marqueurs	101
IV.	Discussion	103
IV.1.	Cinétique de survie de souches d' <i>E. coli</i> d'origine différente dans les sols	104



IV.2.	Suivi de l'état physiologique des <i>E. coli in vitro et in situ</i>	105
<b>Chapitre 4 : Structure génétique des populations d'<i>E. coli</i> dans les différents compartiments du Bassin Versant de l'Alpage de Bise</b>		<b>109</b>
I.	Introduction	114
II.	Materials and methods	116
II.1.	Site description.	116
II.2.	Sampling of soils, cow pats, cattle feces and wild fauna excrements	116
II.3.	Water samples: sampling and treatments	117
II.4.	DNA extraction from <i>E. coli</i> enriched cultures of soil and cow pat samples	118
II.5.	Direct DNA extraction from cattle feces and wild-fauna excrements	118
II.6.	Polymerase chain-reaction (PCR)-DGGE of <i>E. coli uidA</i> gene	118
II.7.	DGGE fingerprints analyses	119
II.8.	Sequencing of <i>uidA</i> from DGGE bands and <i>E. coli</i> isolates	119
II.9.	Phylogenetic analysis of <i>uidA</i> alleles encountered in the watershed	119
II.10.	Statistical analyses	120
II.11.	Inoculation experiments	120
II.11.1.	Preparation of cells	120
II.11.2.	Preparation of microcosms	120
II.11.3.	Enumeration of <i>E. coli</i>	120
III.	Results	121
III.1.	Population density and genetic relatedness of <i>E. coli</i> populations collected in the Bise watershed.	121
III.2.	<i>E. coli</i> populations at the discharge of the watershed	121
III.3.	Potential sources of water contamination	122
III.4.	<i>E. coli</i> populations in different soils	123
III.5.	Watershed functioning	123
III.6.	Survival of <i>E. coli</i> isolates with diverse origins in the <i>Rumex</i> and <i>Poa</i> soils	124
IV.	Discussion	125
V.	Acknowledgments	128
VI.	References	129
<b>Conclusion générale et perspectives</b>		<b>132</b>
<b>Références bibliographiques</b>		<b>142</b>
<b>Annexes</b>		<b>171</b>



## Liste des abréviations utilisées

ABNC : Active But No Culturable  
ADN : Acide Désoxyribonucléotidique  
ADNr16S : Gène codant la petite sous-unité de l'ARNr  
AFNOR : Association Française de NORmalisation  
ARN : Acide Ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ARNr : ARN ribosomal  
ARNr16S : Petite sous-unité de l'ARNr  
ARNt : ARN de transfert  
BST : Bacterial Source Tracking  
CFU ou UFC : Colony Forming Unit ou Unité Formant des Colonies  
DAEC : Diffuse Adhesion *Escherichia coli*  
DAPI : Diamidino-4',6-phénylindol-2-dichlorhydrate  
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
DVC : *Direct Viable Count*  
EAEC : EnteroAgregative *Escherichia coli*  
EHEC : EnteroHemorrhagic *Escherichia coli*  
EIEC : EntéroInvasif *Escherichia coli*  
*e.g.* : *exempli gratia*  
EPEC : EnteroPathogenic *Escherichia coli*  
EPS : ExoPolySaccharide  
ERIC-PCR : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR  
ETEC : EnteroToxigenic *Escherichia coli*  
FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization  
FAO : Food and Agriculture Organization  
HFERP : Horizontal Fluorophore-Enhanced Repetitive extragenic Palindromic-PCR  
*i.e.* : *id est*  
LSM : Least square means  
ML : Maximum Likelihood  
MLEE : MultiLocus Enzyme Electrophoresis  
MPN : Most Probable Number  
MU-Glu : 4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide  
MUF : 4-méthylumbelliferone  
NJ : Neighbor-Joining  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PFGE : Pulse Field Gel Electrophoresis  
ppGpp : guanosine 3',5'-bisdiphosphate  
PVD : Pays en Voie de Développement  
QS : Quorum Sensing  
RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA  
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism  
SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique  
SNP : Single Nucleotide Polymorphism  
STEC : ShigaToxin *Escherichia coli*  
STEP : STation d'EPuration  
UPEC : UroPathogenic *Escherichia coli*  
UV : UltraViolet  
*vs* : *versus*



VBNC : Viable But No Culturable

Unités de mesure

K : constante de perméabilité

Kb : kilobase

kD : KiloDalton

g<sup>-1</sup> : par gramme

°C : degré Celsius

j : jour

h : heure

cm : centimètre

ml : millilitre

nm : nanomètre

Pb: paire de bases

Rpm : Rotations par minutes

µm : micromètre



# Liste des figures<sup>1</sup>

## Introduction générale

Figure 1 : Photographie du site d'étude, l'Alpage de Bise	2'
---	----

## Synthèse bibliographique

Figure 2 : Voies de transfert potentielles dans le sol des microorganismes contenus dans les matières fécales déposées à la surface du sol d'après Oliver et al. (2005a)	18'
Figure 3 : Eléments de la structure d'un sol. D'après Duchaufour (1997)	23'
Figure 4 : Triangle de texture	23'
Figure 5 : Synthèse de phéromones impliquées dans la différenciation des cellules entrant en phase stationnaire de croissance. D'après Ishihama (1999)	28'
Figure 6 : Hydrolyse des $\beta$ -D-Glucuronides et du MU-Glu par la $\beta$ -D-Glucuronidase	31'
Figure 7 : Représentation schématique de la structure du biofilm rhizosphérique	32'
Figure 8 : Gènes fonctionnels surexprimés dans les cellules du biofilm par rapport aux cellules en phase exponentielle. D'après Beloin <i>et al.</i> (2003)	33'
Figure 9 : Transcription des gènes <i>fis</i> et <i>dps</i> au cours de la croissance d' <i>E. coli</i> analysée par FISH. D'après Chen <i>et al.</i> (2004)	35'
Figure 10 : Régulation transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle du facteur sigma S. D'après Lange et Hengge-Aronis (1994)	37'
Figure 11 : Action de RMF, le facteur de dimérisation des ribosomes. D'après Ishihama (1999)	38'
Figure 12 : Régulation de la synthèse de <i>rmf</i> lors de la réponse stringente. D'après Izutsu <i>et al.</i> (2001)	38'
Figure 13 : Répartition des différentes souches d' <i>E. coli</i> selon leur mode de pathogénie dans les différents groupes phylogénétiques majeurs. D'après Wirth <i>et al.</i> (2006)	41'
Figure 14 : Représentation de l'opéron <i>uidABC</i> .	43'
Figure 15 : Évènements de mutations sur le gène <i>uidA</i> qui sont apparus au cours de l'histoire évolutive du sérotype <i>E. coli</i> O157:H7. D'après Monday <i>et al.</i> (2001)	43'

## Chapitre 1 : L'Alpage de Bise

Figure 16 : Département de la Haute Savoie	54'
Figure 17 : Carte géologique des Alpes du Nord et position particulière du Chablais	54'
Figure 18 : Le site de Bise	55'
Figure 19 : Carte IGN au 1/25000ème du bassin versant de Bise avec ses deux sous-bassins	55'
Figure 20 : Carte représentant les différentes stations pastorales	58'
Figure 21 : Débit et concentration d' <i>E. coli</i> (prélèvements automatiques) à l'exutoire du bassin versant en fonction de la date (jour julien)	60'
Figure 22: Concentrations en <i>E. coli</i> (prélèvements automatiques) durant les périodes inter-crués en fonction de la date (jour julien)	60'

---

<sup>1</sup> Les « ' » suivant les numéros de page indiquent que la figure se situe au verso de la page mentionnée



Figure 23 : Concentrations d'*E. coli* observées dans l'eau lors d'une crue, exprimées en UFC 100 ml<sup>-1</sup> d'eau. 60'

## Chapitre 2 : Les effectifs bactériens dans les bouses et les différents sols du bassin versant de l'alpage de Bise

Figure 24 : Geographic location of the Bise watershed and of the *Caltha* (1), *Poa* (2), *Rumex* (3) and *Nardus* (4) grasslands. 66'

Figure 25 : Soil coverage by cow pats (m<sup>2</sup>) in a plot of 400 m<sup>2</sup> for each pasture unit studied. 68'

Figure 26 : Numbers of *E. coli* and fluorescent *Pseudomonas* (means ± standard deviation; n = 24 cow pats) in cow pats in the Bise watershed according to pat age.. 69'

Figure 27 : Numbers of *E. coli* and fluorescent *Pseudomonas* in the topsoil layers (downhill topsoil) under snow cover (January 2006; n = 4), during snow melting (May 2006; n = 4) and during the pasture season (August 2006; n = 8) for each pasture unit studied (synchronic approach).. 70'

Figure 28 : Numbers of *E. coli* (A) and fluorescent *Pseudomonas* (B) in each pasture unit (n = 3 pat/soil systems per unit) during summer 2005 according to the diachronic sampling 71'

Figure 29 : Numbers of *E. coli* (A) and fluorescent *Pseudomonas* (B) in *Rumex* and *Poa* grasslands during summer 2006 according to the diachronic sampling. 73'

Figure 30 : Least Square Means (LSM) of data from the 2006' diachronic approach obtained by MANOVA for soil contents in *E. coli* (A) and fluorescent *Pseudomonas* (B). 75'

Figure 31 : Phylogenetic analysis of partial *uidA* sequences obtained at the Bise watershed using *E. coli* isolates and PCR clones 76'

Figure 32 : Effectifs en (A) *Pseudomonas* totaux, en (B) *Pseudomonas* résistants aux antibiotiques et (C) *Pseudomonas* fluorescents spp. *phlD*<sup>+</sup> évalués dans différentes stations et bouses de l'alpage lors du travail préliminaire effectué en 2004. 84'

## Chapitre 3 : Capacités d'adaptation d'*E. coli* au sol

Figure 33 : Cinétique de croissance d'*E. coli* DH10B en milieu LBm à 37°C. 95'

Figure 34 : Cinétiques de survie des souches d'*E. coli* d'origine différente dans des microcosmes de sol de surface prélevé sous la *Poa* (A) et le *Rumex* (B). 95'

Figure 35 : Arbres phylogénétiques obtenus par les méthodes de Neighbour-Joining sur les différents marqueurs de l'état physiologique 96' à 101'

Figure 36 : Exemple de résultats de PCR obtenus pour différentes souches (A) d'*E. coli* pour *dps* et *rmf* et (B) de *P. fluorescens* pour le gène *ftsZ* (phase exponentielle). 103'

Figure 37 : ARNs extraits sur les cultures à différents stades de la croissance 104'

Figure 38 : Exemple de résultats de PCR sur les ADNc obtenus à partir des cultures aux différents stades de la croissance d'*E. coli* DH10B pour l'ensemble des gènes marqueurs 104'

Figure 39 : Exemple des résultats des PCR obtenus dans les microcosmes de *Poa* avec la souche DH5α, la souche issue de la bouse et celle issue du sol sous *Poa*, à 3h et 48h d'incubation, pour les marqueurs *dps*, *rmf*, *ftsZ* et *rpoZ*.. 105'

Figure 40 : Exemple des résultats des PCR obtenus dans les microcosmes de *Rumex* avec la souche DH5α, d'une bouse et du sol sous *Poa*, à 3h et 48h d'incubation, pour les marqueurs *dps*, *rmf*, *ftsZ* et *rpoZ*.. 105'

Figure 41 : Visualisation d'ARN extraits du sol. 107'



## **Chapitre 4 : Structure génétique des populations d'*E. coli* dans les différents compartiments du Bassin Versant de l'Alpage de Bise**

Figure 42 : DGGE gel obtained from <i>uidA</i> PCR on Rumex/oxidized soil samples.	119'
Figure 43 : Phylogenetic analysis of partial <i>uidA</i> sequences obtained at the Bise watershed using <i>E. coli</i> isolates, PCR clones and DGGE-band..	121'
Figure 44 : Cluster analysis of <i>E. coli uidA</i> patterns obtained from water (W), wild fauna (in bold), from rectal samples (fecesX) and from 30 days old cow dejections (30d-cp)	122'
Figure 45 : Repartition of different fingerprints obtained from soil, cow pat and water samples according to a clustering analysis..	123'
Figure 46 : Survival of <i>E. coli</i> in soils collected under <i>Poa</i> (A) and under <i>Rumex</i> (B) grasslands.	124'

### **Conclusion générale**

Figure 47 : Schéma fonctionnel du comportement d' <i>E. coli</i> dans la rhizosphère et le sous-sol de la station « <i>Poa</i> » du Bassin versant de l'Alpage de Bise.	138'
Figure 48 : Schéma fonctionnel du comportement d' <i>E. coli</i> dans la rhizosphère et le sous-sol de la station « <i>Rumex réduit</i> » du Bassin versant de l'Alpage de Bise.	139'
Figure 49 : Schéma fonctionnel du comportement d' <i>E. coli</i> dans la rhizosphère et le sous-sol de la station « <i>Rumex oxydé</i> » du Bassin versant de l'Alpage de Bise	140'



# Liste des tableaux<sup>2</sup>

## **Introduction générale**

Tableau 1 : Résultats des conformités des unités de distribution (UDI) et de la population alimentée à l'échelle des bassins RM&C 2'

## **Synthèse bibliographique**

Tableau 2 : Caractères biochimiques spécifiques de 4 espèces du genre *Escherichia* (*E. coli*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*). D'après Grimont (1987) 8'

Tableau 3 : Nombre de bactéries viables trouvées dans les fèces d'animaux adultes (log de bactéries viables / g de fèces) 8'

Tableau 4 : Mortalité et transfert des bactéries fécales dans le système végétation/sol. D'après Trévisan *et al.* (2002) 11'

Tableau 5 : Réponse de gènes, connus comme régulés par quorum sensing, à l'autoinducteur AI-2 chez *E. coli*. D'après DeLisa *et al.* (2001) 28'

Tableau 6 : Espèces bactériennes dont l'état VBNC a été décrit. D'après Oliver (2005) 30'

Tableau 7 : Ratios d'expression de groupes fonctionnels de gène dans les cellules du biofilm par rapport aux cellules planctoniques en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. D'après Schembri *et al.* (2003) 33'

Tableau 8 : Exemples d'études de la diversité de populations d'*E. coli* naturelles selon différentes approches moléculaires développées à partir d'isolats 42'

Tableau 9 : Comparaison de codons du gène *uidA* différents chez les souches *E. coli* K12 et *E. coli* O157:H- 493-89 possédant l'activité  $\beta$ -D-Glucuronidase et chez la souche *E. coli* O157:H7 ATCC 35150,  $\beta$ -D-Glucuronidase négative. D'après Monday *et al.* (2001) 44'

## **Chapitre 1 : L'Alpage de Bise**

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des propriétés et de la valeur fourragère des principales stations de l'alpage de Bise. 58'

## **Chapitre 2 : Les effectifs bactériens dans les bouses et les différents sols du bassin versant de l'alpage de Bise**

Tableau 11 : Physicochemical and main soils characteristics of the different pasture units and dominant species in the plant community. 67'

Tableau 12 : Least square means (LSM) for *E. coli* and for fluorescent *Pseudomonas* in the four pasture units during pasture season 2005 72'

Tableau 13 : Least square means (LSM) for *E. coli* and for fluorescent *Pseudomonas* in the different pasture units (analysis A; 3 treatments) and in the different soils layers (analysis B; 12 treatments) during pasture season 2006 74'

---

<sup>2</sup> Les « ' » suivant les numéros de page indiquent que le tableau se situe au verso de la page mentionnée



### **Chapitre 3 : Capacités d'adaptation d'*E. coli* au sol**

Tableau 14 : Séquences, températures d'hybridation des amorces ainsi que les longueurs amplifiées chez *E. coli* et *Pseudomonas* spp. 94'

Tableau 15 : Valeurs de dN/dS obtenues pour les familles des *Enterobacteriaceae* et des *Pseudomonadaceae* pour les différents marqueurs étudiés 102'

Tableau 16 : Test de spécificité des différentes amorces sur différentes espèces bactériennes. 102'

Tableau 17: Tableau récapitulatif des signaux obtenus pour les différents gènes marqueurs sur les ADNc synthétisés à partir des ARNs extraits de différents microcosmes 106'

### **Chapitre 4 : Structure génétique des populations d'*E. coli* dans les différents compartiments du Bassin Versant de l'Alpage de Bise**

Tableau 18: Occurrence of each DGGE band types found in animal dejections (A and B), soil samples (B) and in water (C). 120'



# **Introduction générale**



## Introduction générale

La qualité de l'eau est une problématique mondiale pour la santé humaine et animale. Elle relève de plusieurs critères relatifs à des paramètres physico-chimiques (turbidité, azote, phosphore, carbone, hydrocarbures, métaux lourds, xénobiotiques et produits phytosanitaires) ou microbiologiques (Enterocoques, coliformes fécaux, *Escherichia coli*, virus et parasites). Dans les Alpes du Nord, considérées comme le « Château d'eau » de l'Europe, l'eau est utilisée pour l'alimentation en eau potable des hommes et des animaux, la fabrication fromagère et les activités de loisirs, notamment la pêche, les activités de baignade et les sports d'eaux vives, ces derniers étant actuellement en pleine expansion. La surveillance de la qualité de l'eau prend une ampleur particulière dans le contexte montagnard, ce dernier étant marqué par une forte connectivité des ressources en eau de l'amont vers l'aval, par la multitude des points de captage d'eau et la diversité des systèmes de distribution. La situation sanitaire de ces eaux est rarement en accord avec l'image de l'eau pure de montagne vis-à-vis des critères microbiologiques. On estime que 30 % des réseaux de distributions sont non-conformes et que 15 % de la population est ainsi exposé à un risque microbiologique (Tableau 1). Ce sont surtout les personnes âgées et les jeunes enfants qui sont touchés par la dégradation microbiologique de l'eau (DRASS Rhône-Alpes, 2005). Les ressources en eau se constituent en tête de bassin versant, là où se situent les prairies subalpines pâturées. Or, le pâturage est une source potentielle de pollution fécale des eaux avec l'excrétion de bactéries fécales dans les fèces déposés sur le sol ou plus directement dans l'eau (Oliver *et al.*, 2005b). Classiquement, dès l'arrivée des troupeaux en alpage, la concentration en bactéries fécales s'accroît pour atteindre des niveaux supérieurs aux exigences de qualité de l'eau. La question de l'impact du pâturage sur la dégradation de la qualité de l'eau est bien étudiée en Ecosse, en Angleterre ou encore en Nouvelle-Zélande où le pâturage ovin est prédominant (Kay *et al.*, 2007 ; Collins & Rutherford, 2004 ; Hubbard *et al.*, 2004 ; Vinten *et al.*, 2004 ; Edward, 2003 ; Fisher *et al.*, 2000). Toutefois, peu de données ont été collectées sur la survie des contaminants fécaux dans les sols et les bassins versants subalpins laitiers. Les enjeux de qualité de l'eau y sont importants, avec notamment des objectifs fixés par la politique agricole commune, portant sur l'adoption de pratiques agricoles compatibles avec le maintien des ressources naturelles. Il est indispensable de mieux comprendre le comportement des contaminants fécaux dans les sols de ces milieux particuliers, afin d'évaluer la probabilité des

	Bassin Rhône Méditerranée et Corse
% UDI non conformes	30,6 %
% UDI conformes	69,4 %
% populations associé à des UDI non conformes	15,8 %
% populations associé à des UDI conformes	84,2 %

Tableau 1 : Résultats des conformités des unités de distribution (UDI) et de la population alimentée à l'échelle des bassins RM&C (Année 2005, Source : ministère chargé de la santé, DDASS, SISE-Eaux)

transferts sol/eau des bactéries fécales bovines et ainsi mieux appréhender l'impact du pâturage sur la qualité des ressources en eau en tête de bassin versant.

Au delà de la spécificité du contexte des bassins versants subalpins, de nouvelles connaissances sur l'écologie d'*E. coli* dans les sols des systèmes pâturés sont nécessaires. Si on connaît bien les conditions de transfert et de survie d'*E. coli* dans les sols suite à l'épandage d'effluents (Oliver *et al.*, 2005a), la situation est moins bien documentée dans le cadre du pâturage, ce dernier se traduisant pour une grande hétérogénéité dans la répartition des déjections. De même, il y a peu de données concernant l'état de division ou de dormance des bactéries fécales, les seuls outils existants étant centrés sur la différenciation des cellules viables et des cellules moribondes. La diversité génétique des bactéries fécales dans les sols est également peu documentée, les principales approches ne décrivant quasi-exclusivement que les populations majoritairement présentes et les approches populationnelles étant rares (Sigler & Pasutti, 2006). Enfin, pour évaluer le comportement de bactéries introduites dans un sol, un référentiel bactérien est nécessaire. Or, peu d'études décrivant la survie d'*E. coli* prennent en compte le comportement des populations indigènes, adaptées à l'environnement sol.

Dans le cas où les bactéries sont introduites à la suite d'épandages de matière organique d'origine fécale (fumier, lisier), les voies de transfert des bactéries fécales dans le sol sont assez bien documentées (Oliver *et al.*, 2005a) ; elles dépendent notamment de la faune tellurique, de l'organisation du système poral du sol et de ses conséquences sur les flux d'eau. Dans le sol, les bactéries fécales sont soumises à des contraintes abiotiques, qui sont fonction du pédoclimat et des propriétés de la matrice sol. Elles sont également soumises à des contraintes biotiques selon la dynamique de la faune et de la microflore du sol. On se demande si ces voies de transfert peuvent être étendues au cas du pâturage et notamment aux spécificités de contact entre la bouse et le sol. Dans la mesure où les bouses demeurent en surface un certain laps de temps (de 60 jours dans le Jura Suisse à plusieurs années en Colombie britannique ; Gobat *et al.*, 1998), il y a introduction et diffusion prolongée de substrats carbonés et de nutriments, correspondant au milieu d'origine des bactéries fécales. Par ailleurs, une fois introduites dans le sol, les bactéries fécales sont susceptibles de mettre en place des stratégies de survie particulières, leur permettant de s'adapter à cette nouvelle niche écologique et de s'y installer (Byappanahalli & Fujioka, 2004). Il se pose ainsi la question de l'évolution des populations bactériennes. Elles ne sont, *a priori*, pas toutes dotées du même potentiel de survie dans l'environnement sol, dont les caractéristiques physicochimiques (texture, structure et matière organique) varient fortement dans le temps et



Figure 1 : Photographie du site d'étude, l'Alpage de Bise (Haute-Savoie, Massif du Chablais)

l'espace, et plus particulièrement dans les situations des agroécosystèmes pâturés d'altitude (Dorioz, 1987).

L'objectif général de ce travail est d'améliorer les connaissances sur l'écologie d'*E. coli* dans les sols des écosystèmes pastoraux, afin de mieux appréhender les facteurs susceptibles de contrôler la dispersion, la dynamique et la structure des populations de bactéries fécales bovines dans les sols pâturés par des troupeaux.

Pour répondre à cet objectif, nous avons retenu comme site d'étude un alpage sur un bassin versant de moyenne montagne situé dans les pré-Alpes calcaires du Chablais (Figure 1). L'alpage retenu est un site modèle pour l'étude du devenir environnemental des bactéries fécales dans les sols pâturés du fait des conditions climatiques, de la diversité des sols et des communautés végétales qui le structurent.

Les objectifs spécifiques sont de déterminer les facteurs impliqués dans le devenir des populations de bactéries fécales bovines dans les différents niveaux d'organisation du bassin versant (dans les bouses, les stations pastorales et l'eau), d'évaluer en particulier leur potentiel de transfert et de survie, ainsi que leur état physiologique. Pour y répondre, un suivi de la dynamique des populations de bactéries fécales bovines est réalisé. Il s'agit de comparer les effectifs bactériens dans différentes stations pastorales et à différentes échelles spatiales (bouses, sol de surface, de profondeur, sol sous bouse, sol en aval de bouses) et temporelles (en été au cours de la saison pastorale, en hiver sous le manteau neigeux, au printemps à la fonte des neiges). On cherche en 2<sup>nd</sup> lieu à évaluer la structure génétique des populations de bactéries fécales de façon à déterminer si des génotypes sont préférentiellement sélectionnés et si cette sélection s'opère pour (i) seulement certains sols, (ii) dans des horizons particuliers et (iii) à des stades particuliers de l'évolution de la contamination (durée d'exposition des sols aux bouses). La structure génétique des populations dans l'eau à l'exutoire est étudiée en parallèle et confrontée à celle des sols afin de discriminer les espaces actifs contribuant aux contaminations.

*E. coli* est choisi comme modèle bactérien indicateur de contamination fécale car il est énuméré en tant que tel pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau. Pour disposer d'une référence relative au fonctionnement des populations bactériennes adaptées au milieu sol, nous comparons le comportement d'*E. coli* à celui de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Ces derniers correspondent à une population tellurique dominante et adaptée à la rhizosphère des graminées. Ils sont en outre producteurs de phloroglucinols, antibiotiques à large spectre d'action (Cronin *et al.*, 1997).



Pour répondre à ces différents objectifs, une démarche pluridisciplinaire associant sciences du sol, écologie microbienne et agronomie pastorale est mise en oeuvre. Le travail est organisé en 6 parties :

✓ Une synthèse bibliographique porte sur la présentation de l'espèce bactérienne *E. coli* et les facteurs contrôlant sa survie dans l'environnement. L'effort porte ensuite sur les différents états physiologiques dans lesquels *E. coli* peut être retrouvé dans l'environnement. Enfin, la diversité des populations d'*E. coli* dans différents environnements et les techniques d'étude de cette diversité sont présentées.

✓ Une partie expose les hypothèses et la démarche de travail, formulées à partir de l'état des connaissances réalisé dans la synthèse bibliographique

✓ Un premier chapitre présente le bassin versant étudié, l'alpage de Bise, en tant (i) qu'agro-écosystème et support d'une diversité de sols, de communautés végétales et de conditions rhizosphériques et (ii) qu'hydro-écosystème transférant à l'exutoire les bactéries fécales introduites dans les différentes stations de l'alpage par l'activité pastorale.

✓ Un second chapitre présente les effectifs de populations d'*E. coli* et de *Pseudomonas* spp. fluorescents observés à l'entrée du système étudié c'est-à-dire dans les bouses et dans les différents sols de l'alpage. Cette étude permet de répondre à des questions concernant (i) les modalités de transferts des *E. coli* des bouses vers le sol, (ii) l'adaptation des populations fécales aux sols et (iii) la constitution d'un réservoir environnemental en *E. coli*.

✓ Le chapitre 3 aborde la question des capacités d'adaptation d'*E. coli* à une nouvelle niche écologique, le sol, ainsi que la mise au point d'une méthode moléculaire permettant de suivre l'état physiologique d'*E. coli* dans l'environnement. Ce chapitre comporte deux volets de travail : le 1<sup>er</sup> est relatif aux cinétiques de survie dans des microcosmes de sol de souches d'*E. coli* d'origine différente, le 2<sup>nd</sup> au suivi de l'expression de marqueurs moléculaires de l'état physiologique d'*E. coli in vitro* et dans des microcosmes de sol.

✓ Le chapitre 4 décrit la structure génétique des populations d'*E. coli* dans les différents niveaux d'organisation du bassin versant : dans les bouses, les différents sols et



dans l'eau à l'exutoire. Cette approche permet d'analyser les transferts des populations d'*E. coli* entre ces différents niveaux et la contribution de ces derniers à l'alimentation du cours d'eau en contaminants fécaux.

Enfin une conclusion générale clôt ce manuscrit en intégrant l'ensemble des résultats et met en perspectives les principaux concepts qui émanent de ce travail de thèse.



## **Synthèse bibliographique**



## Synthèse bibliographique

### I. L'espèce *Escherichia coli*, un modèle écologique intéressant

*Escherichia coli*, plus communément appelé colibacille, a été découvert en 1885 par Théodore Escherich dans des selles de nourrissons. *E. coli* est une bactérie associée au tractus intestinal des animaux à sang chaud, et notamment de l'être humain. Bien que les souches d'*E. coli* soient généralement commensales du tube digestif (*i.e.* bénéficiant de l'interaction avec leur hôte sans avoir d'effet négatif sur ce dernier), certaines peuvent être associées à diverses pathologies chez l'homme et l'animal (gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies).

Le modèle *E. coli* est intéressant puisqu'il présente à la fois des souches commensales et des souches pathogènes de l'homme, sans être, pour autant, un pathogène opportuniste (*i.e.* bactérie qui devient pathogène chez un hôte affaibli) tel que *Pseudomonas aeruginosa* ou bien *Staphylococcus epidermidis* (Wei *et al.*, 2006).

#### I.1. *E. coli*, une bactérie commensale de l'intestin des animaux à sang chaud

*E. coli* appartient au groupe des coliformes fécaux (ou thermotolérants). Les coliformes sont définis comme des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, oxydase négatives, asporulentes et capables de fermenter le lactose à 35°C. Ce sont des bacilles à Gram-négatif appartenant à la classe des  $\gamma$ -protéobactéries. Outre ces caractéristiques, les coliformes fécaux sont également capables de croître à 44°C et possèdent une activité catalase. En plus de l'espèce *E. coli*, ce groupe contient les genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. *E. coli* est cependant le seul coliforme fécal à produire de l'indole à partir du tryptophane à 44°C, ce qui permet de le différencier des autres coliformes fécaux. Il est classiquement admis que parmi ces bactéries seul *E. coli* est toujours d'origine fécale. En effet, les autres membres de ce groupe peuvent avoir une origine environnementale : *Klebsiella oxytoca* et *Citrobacter* spp. ont été isolés du sol, de végétaux et *Enterobacter cloacae* est retrouvé dans le sol rhizosphérique (Soriano *et al.*, 2001 ; Adachi *et al.*, 2002 ; Rattray *et al.*, 1995). Excepté le cas d'*E. coli*, la dénomination « coliformes fécaux » est donc inappropriée et il est préférable d'utiliser l'appellation « coliformes thermotolérants » (Foppen & Schijven, 2006).

Tableau 2 : Nombre de bactéries viables trouvées dans les fèces d'animaux adultes (log de bactéries viables par g de fèces)

Animaux	<i>E. coli</i>	<i>Cl. perfringens</i>	<i>Enterococci</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Lactobacilli</i>
Vaches	4.3	2.3	5.3	0	2.4
Moutons	6.5	4.3	6.1	0	3.9
Chevaux	4.1	0	6.8	0	7.0
Porcins	6.5	3.6	6.4	5.7	8.4
Volailles	6.6	2.4	7.5	0	8.5
Lapins	2.7	0	4.3	8.6	0
Chiens	7.5	8.4	7.6	8.7	4.6
Chats	7.6	7.4	8.3	8.9	8.8
Souris	6.8	0	7.9	8.9	9.1
Hommes	6.7	3.2	5.2	9.7	8.8

Moyenne de 10 animaux, Modifié d'après Rosebury, T. : *Micro organisms Indigenous to man*. Mc Graw-Hill, New York, 1962

Tableau 3 : Caractères biochimiques spécifiques de 4 espèces du genre *Escherichia* (*E. coli*, *E. hermanii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii*). D'après Grimont (1987)

Caractéristiques	<i>E. coli</i> non O157:H7	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. hermanii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. fergusonii</i>
Pigment jaune	-	-	+	(+)	-
LDC	(+)	(+)	-	+	+
ODC	+/-	+/-	+	-	+
$\beta$ -xylosidase	-	-	-	+	-
$\beta$ -glucuronidase	(+)	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	+	-
Indole	+	+	+	-	+
Adonitol	-	-	-	-	+

(+), positif pour la majorité des souches ; +/-, positif ou négatif selon les souches; LDC, Lysine Décarboxylase ; ODC, Ornithine Décarboxylase

D'une façon générale, la diversité microbienne présente dans les déjections animales varie quantitativement et qualitativement en fonction des animaux. Dans les fèces des bovins, on trouve principalement *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus* spp. et *Lactobacillus* spp. (Tableau 2). *E. coli* est le principal taxon de la microflore gastrointestinale aérobie et peut représenter jusqu'à 97 % des coliformes isolés de fèces humains et 90% de fèces d'animaux (Greatorex & Thorne, 1994 ; Pourcher, 1991 ; Ghebru, 1988 ).

Sur le plan taxonomique, le genre *Escherichia* appartient à l'ordre des *Enterobacteriales* qui ne compte qu'une seule famille, les *Enterobacteriaceae*. Cette famille comporte 41 genres, comme par exemple, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Buchnera*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, etc (Edward & Ewins, 1972). Les *Enterobacteriaceae* sont présentes dans divers environnements tels que le tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud, dans le sol et l'eau, etc. Certaines *Enterobacteriaceae* sont également connues pour être associées aux plantes telles que les bactéries phytopathogènes *Pectobacterium* spp. (anciennement dénommées *Erwinia*), *Pantoea stewartii* ou *Serratia marcescens* (Hauben *et al.*, 1998).

Le genre *Escherichia* compte 6 espèces possédant chacune des caractéristiques biochimiques particulières : *E. coli*, *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris* (Garrity *et al.*, 2002). *E. senegalensis* serait une 7<sup>ème</sup> espèce définie par Mbengue *et al.* (source : *National Center for Biotechnology Information*) mais elle n'a pas encore été validée. *E. coli* se distingue des autres espèces par sa capacité à fermenter le lactose (Tableau 3 ; Grimont 1987).

Dans le cadre de l'évaluation des risques de contamination microbiologique des eaux et des aliments, *E. coli* est utilisée comme espèce indicatrice de contamination fécale, c'est-à-dire un indicateur d'un risque sanitaire potentiel et probable. Elle est en effet utilisée pour évaluer la présence potentielle de pathogènes d'origine digestive tels que *Shigella*, *Salmonella* ou certaines souches d'*E. coli*.

## I.2. *E. coli*, un pathogène humain

Même si la majorité des souches d'*E. coli* sont commensales du système digestif, certaines sont à l'origine de diverses pathologies intestinales et extra-intestinales telles que des diarrhées, des infections urinaires, des septicémies et des méningites chez le nouveau-né



(Orskov & Orskov, 1992). Elles font donc l'objet de l'attention du monde médical et agroalimentaire.

La différenciation entre souches pathogènes et souches commensales repose sur la détermination de leurs sérotypes (Orskov & Orskov, 1984). Les sérotypes résultent de la combinaison entre un antigène somatique O, définissant le sérotype, et un antigène flagellaire H. L'antigène O est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne des souches à gram négatif. L'antigène H, de nature protéique, entre dans la structure du flagelle qui permet à la bactérie de se déplacer. Enfin, il existe un 3<sup>ème</sup> antigène qui n'est pas toujours présent, l'antigène de surface K. Il existe plus de 150 antigènes O, 56 antigènes H et 80 antigènes K, lesquels peuvent être combinés entre eux, multipliant le nombre de sérotypes possibles (plus de 800000). Actuellement, uniquement 2000 d'entre eux ont été isolés (Frémaux, 2007). Certaines sérogroupes, comme K12, sont rarement associés à des pathologies. En revanche, d'autres, comme O157, le sont très fréquemment (cas du sérotype O157:H7).

C'est l'identification de facteurs de virulence chez les souches pathogènes qui permet de les différencier des souches commensales ainsi que des autres souches pathogènes. Elles sont regroupées en pathotypes en fonction des syndromes qu'elles provoquent chez l'homme, chaque pathotype exprimant généralement des facteurs de virulence spécifiques (Mainil, 2003). Les souches d'origine extra-intestinale peuvent être subdivisées en 3 pathotypes : uropathogènes (UPEC), mammopathogènes et invasifs. Les souches intestinales sont : (i) les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC), responsables de diarrhées et d'infections urinaires, (ii) les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) associés aux diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de développement et à la « turista », la diarrhée du voyageur (Levine, 1987), (iii) les *E. coli* entérotoxinogènes (EPEC) responsables de gastro-entérites chez les enfants de moins de 3 ans (Jerse *et al.*, 1990), (iv) les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC) responsables de retards de croissance et de diarrhées persistantes aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés (Kaper, 2005), (v) les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) phylogénétiquement proches de pathogènes humains, *Shigella* spp., (Escobar-Páramo *et al.*, 2003 ; Brenner *et al.*, 1973) et enfin, (vi) les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) responsables de diarrhées peu hémorragiques mais qui peuvent s'aggraver en colites hémorragiques et dans certains cas, en syndromes hémolytiques et urémiques (SHU, en particulier chez le jeune enfant) pouvant conduire à la mort (Riley *et al.*, 1983). Les facteurs de virulence des EHEC sont variés et codés par le gène *stx1* ou *stx2* (shigatoxines), le gène *eae* (facteur d'attachement et d'effacement des microvillosités) ou encore le gène *ehx*



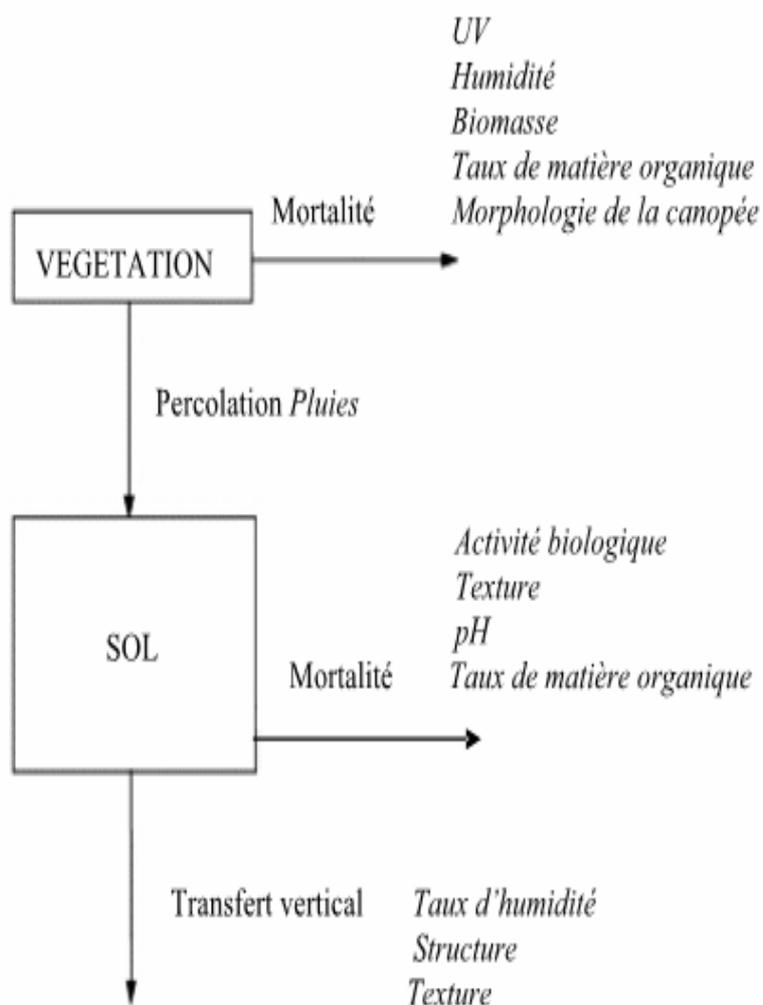
(entérohémolysine) (Schmidt *et al.*, 1995). Parmi les EHEC, ceux possédant au moins un gène *stx* appartiennent au groupe des *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC). Tous les STEC ne sont néanmoins pas pathogènes pour l'homme (en particulier en absence des gènes *eae* ou *ehx*).

*E. coli* O157:H7 est le principal STEC responsable de pathologies chez l'homme et donc le plus étudié et connu à ce jour. C'est l'agent le plus généralement impliqué dans des épidémies dues à la consommation de viande bovine contaminée (maladie du hamburger). Ce sérotype se distingue métaboliquement des autres *E. coli* par l'absence d'activité  $\beta$ -D-glucuronidase, protéine codée par le gène *uidA*. Cette enzyme ( $\beta$ -D-glucuronoside glucuronosohydrolase, EC3.2.1.31) est une protéine cytoplasmique de 603 acides aminés et d'un poids moléculaire de 68,447 kD (source : <http://biocyc.org>). Cette hydrolase acide catalyse le clivage d'une grande variété de  $\beta$ -glucuronides généralement solubles dans l'eau (selon la réaction suivante:  $\text{H}_2\text{O} + \beta\text{-D-glucuronide} \rightarrow \text{alcool} + \text{glucuronate}$ ).

Les  $\beta$ -glucuronides sont des hexoses à noyau pyranique. Leur origine est très variée : les urines, la paroi des végétaux, la capsule bactérienne, les cartilages, etc. Dans le tractus gastro-intestinal des animaux, l'activité  $\beta$ -D-glucuronidase bactérienne intervient dans le processus de détoxification de déchets métaboliques endogènes, de vitamines, de xénobiotiques, d'hormones stéroïdiennes, etc, pour permettre leur élimination *via* le tractus urinaire (Liang *et al.*, 2004). Bien que seule l'espèce *E. coli* possède l'activité  $\beta$ -D-glucuronidase parmi le genre *Escherichia* et qu'elle soit surtout connue chez *E. coli*, elle ne lui est pas spécifique (Kämpfer *et al.*, 1991 ; Rice *et al.*, 1991). Cette activité est ainsi retrouvée chez 94 % des souches d'*E. coli* mais aussi pour 44 % des *Shigella* spp. et 29 % des *Salmonella* spp. (Hartman, 1989 ; Moberg *et al.*, 1988 ; Feng & Hartman, 1982). Bien que Hansen *et al.* (1984) aient déterminé la spécificité de cette activité à 36°C chez *E. coli* en testant une collection de 400 souches d'*Enterobacteriaceae* fermentant le lactose, Kämpfer *et al.* (1991) ont montré que d'autres bactéries, *Edwardsiella hoshinae* et *Yersinia kristensenii*, la possèdent à 37°C. A 44°C, cette activité a également été mise en évidence chez *Aerococcus viridans*, *Bacillus* spp., *Staphylococcus paucimobilis* et *Sphingomonas paucimobilis* lors d'expériences enzymatiques de courtes durées (25 minutes) (Tryland & Fiksdal, 1998). La  $\beta$ -D-glucuronidase reste active même lorsque les cellules bactériennes perdent leur cultivabilité, leur intégrité ou ne présente plus d'activité respiratoire (Petit *et al.*, 2000) (voir III.2.1).

Actuellement, les études épidémiologiques suggèrent une nette augmentation d'épidémies impliquant des sources environnementales potentielles de contamination. Cette

Tableau 4 : Mortalité et transfert des bactéries fécales dans le système végétation/sol. Les principaux facteurs de contrôle sont notés en italique. D'après Trévisan *et al.* (2002)



évolution est probablement due aux changements de régime alimentaire avec la consommation croissante de végétaux crus et la forte utilisation d'étendues d'eau naturelle pour les loisirs, eaux pouvant être contaminées par les troupeaux (Frémaux, 2007). Ces épidémies ont ainsi amené les épidémiologistes à explorer l'environnement comme source potentielle de contamination.

Les travaux se référant à la survie d'*E. coli* dans l'environnement se situent sur des problématiques assez différentes : une 1<sup>ère</sup> est basée sur la détermination d'un risque potentiel par l'utilisation d'*E. coli* comme bactérie indicatrice de contamination fécale et une 2<sup>de</sup> est axée sur la détermination d'un risque réel par la recherche de sérotypes particuliers et de gènes de virulence d'*E. coli* pathogènes.

La présence d'*E. coli*, commensale ou pathogène, a ainsi été montrée dans de nombreux habitats secondaires, distincts de l'habitat primaire que constitue le tractus intestinal et les matières fécales des animaux. En ce qui concerne la validité de son caractère indicateur, rappelons que la présence d'*E. coli* dans un environnement autre que son habitat d'origine ne peut être que transitoire. Pourtant, comme nous l'aborderons dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette synthèse bibliographique, *E. coli* est capable de survivre dans différents écosystèmes et de s'adapter à divers types de stress (par exemple l'humidité, la disponibilité en oxygène, la carence en nutriments, la prédation...).

## **II. Survie d'*E. coli* dans l'environnement**

Les alpages sont souvent situés en tête de bassins versants, ces derniers constituant des zones géographiques au sein desquelles toutes les eaux de ruissellement de surface alimentent un exutoire commun. Ils présentent différents niveaux d'organisation, en relation avec le contexte agropastoral et le milieu physique. Ainsi, différents compartiments les constituent : les bouses (stocks primaires d'*E. coli*), la végétation et les sols (stocks secondaires potentiels), l'eau (sortie et vecteur de transfert entre les différents compartiments). La présence d'*E. coli*, commensale ou pathogène, a été détectée dans ces différents écosystèmes et les facteurs biotiques et abiotiques contrôlant sa survie ont été fortement étudiés (Tableau 4). La suite de cette synthèse s'attachera à faire un point sur les modalités de survie d'*E. coli* dans ces différents compartiments.



## II.1. Survie d'*E. coli* dans les matières fécales (bouses et différents effluents d'élevage)

*E. coli* étant une bactérie d'origine digestive, les matières fécales excrétées lors du pâturage ou épandues sur les surfaces agricoles représentent une source potentielle importante d'*E. coli*. Avant d'aborder la question de la survie de cette bactérie dans des environnements secondaires (végétaux, eau et sol), il nous semble important de préciser quelques éléments concernant la survie d'*E. coli* dans son habitat primaire, les matières fécales.

Les concentrations d'*E. coli* dans les déjections animales varient en fonction des animaux allant d'environ  $2.10^4$  cellules par g de fèces chez la vache à  $4.10^8$  chez le chat (Tableau 2). Une grande variabilité des densités d'*E. coli* dans les bouses de vaches a également été rapportée, avec des valeurs comprises entre 0 et  $10^7$  cellules  $g^{-1}$  matière sèche pour une moyenne de  $10^5$  à  $10^6$  cellules  $g^{-1}$  matière sèche (Muirhead *et al.*, 2006 ; Avery *et al.*, 2004). Contrairement à la variabilité inter-bouse observée, les effectifs d'*E. coli* pour une bouse donnée semblent stables dans le temps (Aslam *et al.*, 2004). Le régime alimentaire influe sur les effectifs de O157:H7. En effet, des effectifs plus élevés d'O157:H7 ont été observés dans des déjections de bovins suivant un régime alimentaire à base de maïs, riche en énergie et pauvre en fibres, comparativement à des bovins ayant une alimentation à base d'herbe, plus faible en énergie et plus riche en fibres (Kudva *et al.*, 1997). Le changement d'alimentation de l'herbe au maïs se traduit donc par une augmentation de la densité d'une sous-population particulière. D'une façon plus générale, cette étude suggère qu'un changement d'alimentation, tel qu'il existe lors du transfert des vaches de l'étable à l'alpage, pourrait entraîner une modification de la structure des populations d'*E. coli* dans le système gastrointestinal des bovins.

L'environnement extérieur influence également la survie des bactéries fécales dans la bouse. En premier lieu, la durée de vie d'une bouse est extrêmement variable en fonction de sa localisation et de la communauté d'insectes présente sur le site de dépôt : 60 à 240 jours dans le Jura suisse, 100 à 150 jours en Grande-Bretagne, 300 à 450 jours au Japon, 520 jours en Nouvelle-Zélande, 360 à 1000 jours en Californie et plusieurs années en Colombie britannique (Gobat *et al.*, 1998). Assez rapidement après le dépôt de la bouse, une croûte se forme en surface et favorise la protection des bactéries contre les rayonnements ultra-violets (UV) (Gobat *et al.*, 1998). Un stockage des bouses à des températures inférieures à  $10^{\circ}C$ , telles qu'elles peuvent l'être la nuit sur un alpage, favorise la survie des bactéries fécales. Wang *et al.* (1996) ont ainsi montré qu'*E. coli* O157 survivait mieux dans des bouses à  $5^{\circ}C$



qu'à 37°C. D'autre part, des événements comme la pluie ou l'apport d'urine modifient la salinité au sein de la bouse. Ces variations de salinité ont un impact sur les interactions électrostatiques entre les particules de bouses. Ceci peut alors conduire à une libération de bactéries fécales à partir des microsites au sein desquels elles étaient protégées, influençant ainsi leur survie (Bradford & Schijren, 2002).

Si les bouses sont la principale source potentielle d'*E. coli* dans les alpages pâturés de façon extensive, les bactéries fécales sont le plus souvent apportées lors des épandages d'effluents d'élevages sous forme de fumier, de lisier ou de purin.

Le fumier est un mélange d'excréments et de paille. L'assainissement des tas de fumier avant épandage peut être obtenu par compostage (Frémaux, 2007), l'aération favorisant l'humification du fumier en stimulant l'activité de la microflore aérobie. Cela se traduit par une augmentation de la température (65°C) au coeur des tas de fumier, affectant en retour la survie des bactéries fécales contenues. Kudva *et al.* (1998) ont ainsi montré une meilleure survie d'*E. coli* O157 dans du fumier ovin non aéré que dans du fumier bovin aéré (21 mois contre 47 jours).

Le lisier est un mélange d'excréments et d'urine. Sa constitution est donc relativement liquide. Les teneurs et le maintien des bactéries fécales dans le lisier dépendent d'un nombre important de facteurs : la durée de stockage, la température et le pH ; la teneur en matière sèche et le taux de dilution des matières fécales dans l'urine ; l'espèce animale dont il provient. McGee *et al.* (2001) ont montré qu'*E. coli* O157:H7 survivait plus de 3 mois dans du lisier de bovin mais, cependant, à de faibles concentrations (environ  $10^3$  cellules par g).

La survie d'*E. coli* dans les matières fécales fait de ces dernières une source potentielle importante de contamination fécale du sol. Une application continue de déchets organiques conduit à des évolutions physico-chimiques du sol, et favorise par ailleurs la survie des microorganismes pathogènes (Dazzo *et al.*, 1973).

## II.2. Survie d'*E. coli* sur les végétaux

Lorsque les matières organiques fécales sont épandues ou les déjections bovines excrétées, elles entrent en premier lieu en contact avec la végétation présente à la surface du sol.



De nombreuses données décrivent la capacité d'*E. coli* O157:H7 à coloniser les tissus des végétaux ou leur rhizosphère. En revanche, peu de données sont disponibles concernant cette capacité chez les *E. coli* commensaux.

La survie d'*E. coli* à l'intérieur des tissus végétaux (développement endophyte), à leur surface ou encore dans la rhizosphère associée dépend de la nature du couvert végétal. La rhizosphère est le volume de sol englobant immédiatement les racines vivantes et qui est influencé physiquement, chimiquement et biologiquement par leur activité (Foster, 1998). Ainsi, la composition des exsudats racinaires, source de carbone et d'azote, peut influencer la survie ou encore la sélection de différentes espèces bactériennes.

*E. coli* O157:H7 envahit les tissus de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, des racines jusqu'aux fleurs en circulant dans le système vasculaire (Cooley *et al.*, 2003). Suite à une inoculation à  $10^4$  UFC  $g^{-1}$  de tissu végétal (unités formant colonies), cette souche d'*E. coli* peut se développer jusqu'à  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  de racines sur ou dans les racines et jusqu'à  $2.10^7$  UFC  $g^{-1}$  de tissu végétal sur ou dans les parties aériennes. L'envahissement des racines se fait au niveau des zones d'émergence des racines latérales. Sur la graine d'*A. thaliana*, *E. coli* O157:H7 se localise soit à sa surface soit sous son tégument. Différentes études ont également porté sur les espèces végétales *Medicago truncatula* et *sativa* (Torres *et al.*, 2005 ; Dong *et al.*, 2003, Charkowski *et al.*, 2002). Contrairement au cas d'*A. thaliana*, *E. coli* O157:H7 n'est pas capable de croître sous le tégument de la graine de luzerne alors que d'autres pathogènes entériques comme *Salmonella enterica* sv. *Newport* le peuvent (Charkowski *et al.*, 2002). *E. coli* O157:H7 peut également coloniser la surface, les tissus internes et les stomates du radis (Itoh *et al.*, 1998). De même, cette souche peut infecter différents organes de la pomme comme le tube floral ou les graines (Burnett *et al.*, 2000). Le mode de colonisation des tissus végétaux dépend donc à la fois du végétal, de l'espèce et de la souche bactérienne. Dong *et al.* (2003) ont mené une étude portant sur la relation entre la capacité de différentes bactéries entériques, dont *E. coli* O157:H7 et *E. coli* K12, à coloniser la rhizosphère de la luzerne et celle à coloniser l'intérieur de ses tissus (endosphère). *E. coli* K12 s'est révélé coloniser faiblement la rhizosphère et les tissus de la luzerne même après des inoculations à des concentrations supérieures à  $10^5$  UFC  $g^{-1}$  de tissus ; par ailleurs, il n'a pas été observé de corrélation entre colonisation du sol rhizosphérique et colonisation des tissus végétaux aériens. A l'inverse, *E. coli* O157:H7 colonise le sol au contact des racines de la plante et ses tissus. Une forte corrélation entre les deux potentiels de colonisation est observée, sans que l'on puisse pour autant en expliquer les mécanismes. *E. coli* O157:H7 peut donc survivre sans être obligatoirement en contact direct avec la plante mais uniquement dans une zone sous son



influence. Ainsi, la souche *E. coli* O157:H7, inoculée à environ  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, survit entre 25 et 47 j dans trois sols (limonoargileux, limonosableux et limoneux) en jachère. Par contre, elle persiste plus longtemps dans ces mêmes sols cultivés avec du seigle (47 à 96 j) ou de la luzerne (92 j) (Gagliardi & Karns, 2002). Il existerait donc un effet rhizosphère positif sur la survie d'*E. coli*, cet effet dépendant de l'espèce végétale cultivée mais pas de la texture du sol utilisé. Néanmoins, dans un autre sol limonoargileux, *E. coli* O157:H7, inoculée également à  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, présente des taux de survie identiques en présence ou en absence de plants de maïs (35 j) (Williams *et al.*, 2007). Par contre, cette dernière expérimentation n'a duré que 35 j et l'étude de l'effet rhizosphère mériterait sans doute d'être prolongée.

*E. coli* O157:H7 ne colonise donc pas tous les végétaux et toutes les rhizosphères de la même façon, suggérant des différences de capacités d'adaptation d'*E. coli* O157:H7 en fonction de son hôte et de la nature du milieu récepteur. On retiendra en outre que peu d'études portent sur les relations plantes/*E. coli* non pathogène et que le développement de cette espèce dans la rhizosphère des plantes est encore peu exploré.

### II.3. Survie dans l'eau

*E. coli* est utilisée comme bactérie indicatrice de contamination fécale des eaux. Sa détection dans l'eau est un véritable problème de santé publique puisqu'elle signifie la présence potentielle de pathogènes humains d'origine digestive. Une norme AFNOR (AFNOR NF T 90-414) a été rédigée pour qualifier le niveau de contamination des eaux. Cette norme repose sur la détection de coliformes thermotolérants après croissance sur gélose lactosée au TTC-Tergitol7 à 44°C. Pour être potables, 100 mL d'eau ne doivent contenir aucun coliforme thermotolérant cultivable. Dans la mesure où le milieu TTC Tergitol7 isole plus de 90% d'*E. coli* et que les autres coliformes thermotolérants n'ont pas une origine rigoureusement fécale, les analyses de la qualité de l'eau peuvent être basées uniquement sur la détection d'*E. coli* (AFNOR NF XP T 90-433).

L'environnement aquatique est régi par un ensemble de contraintes chimiques, physiques et biologiques (oligotrophie, variations des températures, rayonnements UV...) pouvant limiter la survie d'*E. coli* (Jones *et al.*, 1999). Une des premières contraintes réside dans la faible accessibilité des nutriments. En effet, ces derniers sont généralement associés sous forme de floccs aux particules ou colloïdes en suspension. Les bactéries autochtones, généralement associées à ces particules sont favorisées aux dépens des bactéries introduites,



comme *E. coli*, lesquelles sont plutôt libres et isolées (état planctonique) dans l'eau (Crump *et al.*, 1998). La survie des bactéries dans l'eau dépend également des variations saisonnières de température. L'augmentation de température au printemps favorise la survie d'*E. coli* (Rhodes & Kator, 1988) ; par contre, les plus fortes températures observées en été ont un effet létal. De plus, l'été, cette augmentation de température s'accompagne généralement d'une exposition à des rayonnements UV forts qui affectent la survie des bactéries fécales (Jones *et al.*, 1999). D'un point de vue physiologique, la lumière est un facteur déterminant pouvant entraîner les cellules vers un état de dormance (détaillé dans le chapitre suivant) (Barcina *et al.*, 1989). Outre les stress physico-chimiques rencontrés dans le milieu aquatique, les interactions biotiques telles que prédation par les bactériophages et compétition avec la microflore indigène conduisent à la régulation des concentrations en bactéries fécales dans l'eau (Artz & Killham, 2002 ; Rhodes & Kator, 1988).

Les sédiments, notamment grâce à la matière organique qu'ils renferment, sont connus pour être des réservoirs en *E. coli*. Leurs concentrations peuvent d'ailleurs y être jusqu'à environ un millier de fois plus élevée que dans l'eau présente à leur surface (Stephenson et Rychert, 1982). L'adsorption des cellules aux sédiments limite l'exposition d'*E. coli* aux facteurs biotiques et abiotiques cités précédemment (Craig *et al.*, 2002). Les argiles, notamment lorsqu'il s'agit de la montmorillinite, favorisent cette adsorption (Faust *et al.*, 1975).

Dans l'environnement aquatique, la survie d'*E. coli* est donc fortement influencée par un nombre important de facteurs tels que la température, la présence de particules en suspensions dans le cours d'eau et de sédiments. Dans le sol, des facteurs supplémentaires sont susceptibles de contrôler la survie d'*E. coli*.

#### II.4. Survie dans les sols

Les sols reçoivent des intrants bactériens lors des épandages d'effluents mais également lors des périodes de pâturage, via les déjections des animaux déposées. Le sol peut donc représenter un réservoir potentiel en *E. coli* pouvant être mobilisé vers le cours d'eau lors d'épisodes pluvieux ou lors d'épisodes de ruissellement importants comme lors de la fonte des neiges. Il est donc à prendre en considération dans l'évaluation des risques de contamination fécale de l'eau.



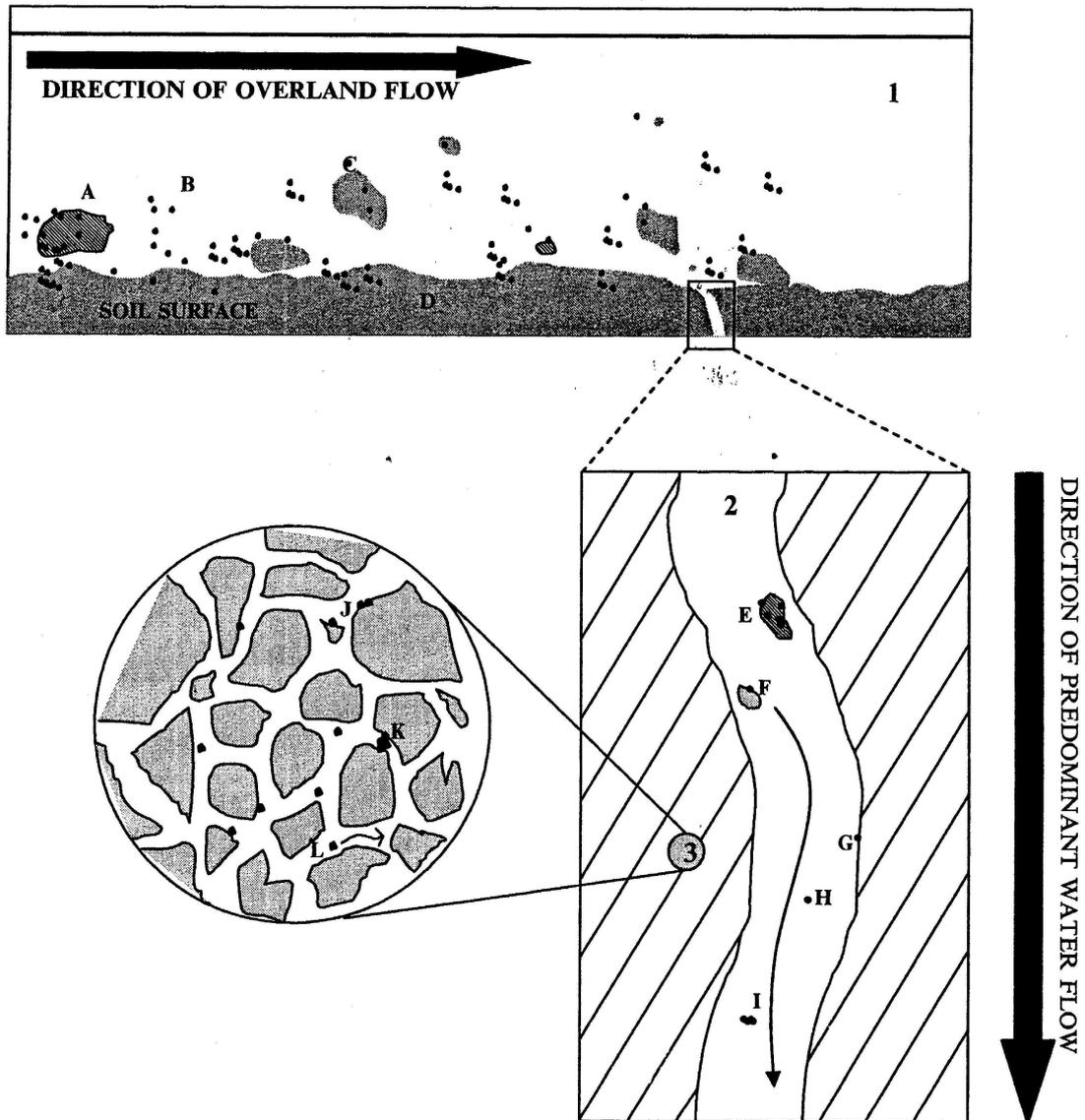
La survie d'*E. coli* et d'autres bactéries fécales dans les sols dépendent d'un ensemble de facteurs qui, la plupart du temps, n'agissent pas individuellement mais en synergie. Ces facteurs peuvent être de nature biotique (protozoaires, vers de terre, bactéries indigènes) ou abiotique (matière organique, humidité, température, pH, structure et texture du sol...). L'impact individuel de la plupart de ces facteurs est très bien documenté dans la littérature et a fait l'objet de nombreuses synthèses (Foppen & Schijven, 2006 ; Oliver *et al.*, 2005a ; Jamieson *et al.*, 2002...).

#### II.4.1. Modalités de transfert d'*E. coli* vers le sol

Avant d'évoquer les facteurs contrôlant la survie d'*E. coli* dans le sol, nous proposons de développer les modalités de transfert bactérien des bouses vers le sol.

Sous l'effet des phénomènes de rétention et de filtration, une fraction limitée des populations bactériennes présentes à la surface du sol est susceptible d'être entraînée dans le sol (Crane *et al.*, 1983). Après les dépôts de matières fécales à la surface du sol, différents phénomènes de transfert des bactéries fécales dans le sol sous-jacent ont été mis en évidence. Dans le cas particulier du pâturage, lorsque les bouses sont fraîchement déposées, elles sont rapidement colonisées par une succession complexe d'insectes (notamment des coléoptères dont le bousier) et de vers dont certains (Scarabéidés, vers de terre) conduisent à l'incorporation de fragments de bouse dans le sol (Gobat *et al.*, 1998). Les vers de terre peuvent donc être considérés comme des vecteurs d'*E. coli*. Toutes les espèces de vers de terre n'explorent pas le sol de la même façon. A titre d'exemple, *Lumbricus terrestris* est une espèce explorant le sol plutôt en profondeur alors que *Dendrobaena veneta* reste plutôt dans l'horizon de surface riche en matière organique (Williams *et al.*, 2006). Les espèces de vers de terre colonisant le sol facilitent donc le transfert d'*E. coli* de la bouse vers les sols. En parallèle, les vers de terre agissent sur la microflore totale du sol, indigène et introduite, en augmentant le stock de carbone labile et donc en enrichissant le sol en nutriments facilement assimilables (Tiunov & Scheu, 2000).

Le sol est classiquement partagé entre macro et microporosité (<50 µm). Le réseau de tunnels formés par le passage des vers de terre dans le sol (la drilosphère) est assimilé à la macroporosité du sol (Joergensen *et al.*, 1998). Dans les macropores, les bactéries fécales introduites peuvent (i) être transférées verticalement avec les particules de matières fécales, (ii) adhérer aux racines des plantes, (iii) s'adsorber aux parois des macropores ou (iv) être



### 1. OVERLAND FLOW

- A: Microbial transfer within dislodged fecal material in direction of flow
- B: Micro-organisms freely suspended in overland flow pathway (both isolated and consortia)
- C: Soil-particle associated transfer
- D: Retention of cells in soil surface layers

### 2. SOIL MACROPORE

- E: Microbial transfer within waste particles
- F: Soil-particle associated transfer
- G: Microbial adsorption to macropore wall and consequent ripening effect with time
- H: Microbial advection (movement of unattached organisms carried by water in direction of flow)
- I: Transfer of microbial flocs via advection

### 3. SOIL MATRIX

- J: Microbial adsorption within matrix
- K: Bio-clogging (blocking of pores through straining and filtering of cells)
- L: Microbial dispersion (movement of organisms carried by water in direction other than that of flow)

Figure 2 : Voies de transfert potentielles dans le sol des microorganismes contenus dans les matières fécales déposées à la surface du sol d'après Oliver *et al.* (2005)

transférées à la surface de particules de sol en mouvement. Elles peuvent aussi circuler à l'état libre en relation avec des mouvements d'advection et de dispersion (Figure 2). Au niveau de la microporosité du sol, les phénomènes d'adsorption aux parois des micropores sont également observés ainsi que des phénomènes de biocolmatage, correspondant au blocage d'un pore par une cellule bactérienne (Oliver *et al.*, 2005b). Même si les cellules bactériennes peuvent être transférées dans le sol grâce à leur propre mobilité, la végétation favorise leur infiltration en facilitant leur passage dans la matrice sol au contact des racines (Muirhead *et al.*, 2006 ; McInerney, 1991).

Les sols saturés représentent un cas assez particulier où les transferts d'eau en profondeur sont limités. En effet, en conditions de saturation, le ruissellement est intense (Muirhead *et al.*, 2006a). Dans ce cas, les cellules d'*E. coli* sont plutôt transportées à l'état libre ou attachées à de petites particules (Muirhead *et al.*, 2006a,b). Dans ces conditions saturées, la rétention des cellules dans le sol dépend des flux préférentiels d'eau, des propriétés d'adhésions des différentes populations d'*E. coli* et de la présence de composés végétaux organiques et inorganiques (Foppen & Schijven, 2006 ; McInerney, 1991).

L'évaluation des capacités de transfert d'*E. coli* des bouses vers les sols et à travers différents types de sols nous a amené à prendre en considération les facteurs abiotiques et biotiques pouvant affecter la survie d'*E. coli* dans les sols.

#### II.4.2. Contrôle abiotique de la survie d'*E. coli*

L'influence des facteurs abiotiques sur la survie et la croissance d'*E. coli* dans le sol, après apport de matière organique exogène, est bien documentée dans les sols tempérés et tropicaux humides mais relativement peu dans les sols en milieu montagnard, où pourtant les intrants organiques peuvent être abondants, notamment dans les zones pâturées. Humidité et constance des températures sont des facteurs de contrôle favorables à la décomposition de la matière organique et au maintien d'*E. coli* dans les sols. Même si la microflore indigène est plus apte à se procurer des nutriments qu'*E. coli*, cette bactérie est tout à fait capable de survivre dans divers sols. Ses populations y sont d'ailleurs bien installées même si présentes à de faible densité. Entre  $10^2$  et  $10^5$  *E. coli* par  $g^{-1}$  de sol sec ont été retrouvés dans différents sols tropicaux, montrant ainsi leur capacité de résidence dans des conditions différentes de celles du tractus intestinal des animaux (Byappanahalli *et al.*, 1998, 2004).



#### II.4.2.i. Contenu en eau, humidité et oxygène

Les populations microbiennes introduites dans les sols sont présentes dans la phase aqueuse et à l'interface liquide/solide. Le contenu en eau d'un sol affecte donc la survie et le mouvement des microorganismes (Mawdsley, 1995).

L'humidité du sol est un facteur prépondérant puisqu'elle détermine la disponibilité en oxygène du milieu. D'une façon générale, l'activité microbienne aérobie augmente avec le contenu en eau du sol, ceci jusqu'à ce que l'eau limite la diffusion et la disponibilité de l'oxygène (Balesdent *et al.*, 2000), rendant le milieu anaérobie. Des conditions légèrement anaérobies favorisent la persistance des bactéries fécales (Oliver *et al.*, 2005a). *E. coli* étant aérobie facultative, elle est capable de survivre dans des sols inondés ou saturés. Par contre, sa survie est plus limitée dans des sols exondés (Tate *et al.*, 1978). Des différences de survie d'*E. coli* ont été rapportées entre sol inondé et sol humide en fonction de la disponibilité en oxygène. En conditions d'oxygénation des eaux du sol, des niveaux de survie identiques ont été notés que le sol soit humide ou inondé. Par contre, en conditions de déficit en oxygène, une meilleure survie a été observée dans un sol inondé par rapport à un sol humide. *E. coli* survit également bien dans des nappes d'eau après des pluies (Hagedorn *et al.*, 1978). Ces épisodes pluvieux conduisent à la désorption des composés organiques, et augmentent leur biodisponibilité (Balesdent *et al.*, 2000). Une trop forte humidité des sols peut néanmoins avoir un effet négatif sur les populations bactériennes fécales par effet de dilution des nutriments, notamment du carbone (Chandler & Craven, 1980).

#### II.4.2.ii. Température

Dans le tractus gastrointestinal humain, *E. coli* vit à des températures constantes voisines des 37°C, sa température optimale de croissance. Dans le sol, les températures sont beaucoup plus fluctuantes en fonction des saisons et lors de l'alternance jour/nuit, notamment en montagne. La température est donc un facteur important à prendre en compte pour la survie d'*E. coli* dans le sol.

De façon assez paradoxale, les bactéries fécales survivent mieux à des températures faibles qu'à des températures élevées (Van Donsel *et al.*, 1967). De la même façon, les bactéries pathogènes de l'homme survivent mieux à des températures inférieures à 15°C qu'à des températures supérieures (Davenport *et al.*, 1976). Ainsi, Cools *et al.* (2001) ont montré une meilleure survie d'*E. coli* dans des sols incubés à 5°C (68 jours) *versus* 25°C (26 jours) pour un même sol. La mortalité d'*E. coli* double lorsque la température augmente



de 10°C, pour des températures comprises entre 5°C et 30°C (Reddy *et al.*, 1981). En outre, *E. coli* O157:H7 reste viable dans un sol gelé (Gagliardi & Karns, 2000). A une température inférieure au gel, une meilleure survie d'*E. coli* dans les sols que dans les fèces a même été montrée (Van Donsel *et al.*, 1967). Dans un sol sous forêt tempérée, la survie d'*E. coli* ne semble pas influencée par la saison et aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre humidité, air, température du sol et effectifs d'*E. coli* (Byappanahalli *et al.*, 2006). Cette observation témoigne de la capacité d'adaptation d'*E. coli* au milieu sol. Les cycles gel/dégel entraînent des fissures dans le sol conduisant à une plus forte aération de ce dernier et donc à son dessèchement. Ainsi, cette modification altère probablement aussi bien la survie des microorganismes autochtones qu'allochtones (Mawdsley, 1995). Les basses températures limitent également directement l'ensemble des activités biologiques du sol comme la respiration, la croissance et les relations de prédateurs et de compétitions entre *E. coli* et les organismes naturels du sol (Cools *et al.*, 2001), exception faite des psychrophiles.

#### II.4.2.iii. pH

D'une façon générale, *E. coli* présente une tolérance à des pH relativement distants de son pH optimal de croissance. Même si celui-ci est compris entre 6 et 7 (Reddy *et al.*, 1981), *E. coli* est capable de survivre à des pH alcalins jusqu'à 8,3 (Sjogren, 1994) ainsi qu'à des pH acides compris entre 5,6 et 6,3 (Van Donsel *et al.*, 1967). Les souches d'*E. coli* non pathogènes résistent mal aux environnements acides (Gerba *et al.*, 1975). En revanche, la souche *E. coli* O157:H7 est acidorésistante, certaines pouvant par exemple survivre plus de 3h à pH1,5 (Arnold & Kaspar, 1995). Les mécanismes génétiques impliqués dans cette acidorésistance sont encore mal connus et font l'objet de travaux de recherche réalisés dans le cadre du projet ANR-05-PNRA-021 « Analyse de la supériorité écologique conférée par l'acido-résistance à des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC), de la fourche à la fourchette » coordonné par C. Vernozy-Rozand (2006-2008).

#### II.4.2.iv. Matière organique

Les cellules d'*E. coli* apportées avec les matières fécales à la surface du sol sont associées à des particules de matière organique qui représentent une source de nutriments importante puisqu'elle apporte de l'énergie sous forme de molécules carbonées. Le sol n'est pas dépourvu de cette matière organique. Bien au contraire, dans le sol, la matière organique



peut être soit sous forme de biomolécules actives (sucres, acides aminés, fraction lipidique), soit sous forme réfractaire, comme par exemple les acides fulviques ou humiques (Arias *et al.*, 2005). La matière organique carbonée facilite la survie d'*E. coli* car elle retient les nutriments, fournit une source de carbone et augmente les capacités de rétention des cellules (Gerba *et al.*, 1975).

La disponibilité en nutriments dans le sol, en particulier le carbone organique utilisable et l'azote, a un impact sur la croissance des bactéries. Même si les bactéries intestinales ont plus d'affinités pour des molécules carbonées simples que pour la matière organique complexe, leur survie est importante dans des sols riches en matière organique, en particulier les histosols (Oliver *et al.*, 2005a ; Tate *et al.*, 1978 ; Gerba *et al.*, 1975). Les histosols sont des sols présentant des fortes teneurs en matière organique dans les 40 premiers cm. Ils favorisent la survie des bactéries fécales non seulement grâce à leur forte teneur en carbone mais également en relation avec les paramètres physicochimiques associés. En effet, ces sols sont la résultante d'un faible drainage qui favorise la conservation de la matière organique qu'ils contiennent. Ce confinement anaérobie est également favorable aux bactéries fécales.

Plus le rapport carbone sur azote (C/N) de la matière organique est faible, plus les processus de la biodégradation des matières organiques sont rapides et prédominants. Ceci a pour conséquence une évolution des propriétés de la matière organique fraîche avec production de résidus organiques évoluant vers des humus (Dommergues & Mangenot, 1970). Cette altération de la matière organique dépend fortement de la disponibilité de l'oxygène dans le sol. Des conditions anaérobies la limitent alors que des conditions aérobies la favorisent (Balesdent *et al.*, 2000). Ainsi, une alternance entre aérobiose et anaérobiose conduit à l'accumulation de matière organique fortement décomposée sous forme de matières colloïdales et solubles telles que les composés humiques et fulviques. Les teneurs en carbone organique décomposé dépendent du type de sol. Un sol sableux sera plus pauvre en carbone organique qu'un sol limoneux qui, à son tour, le sera moins qu'un sol argileux (Guber *et al.*, 2007). Lorsque la matière organique décomposée est localisée dans des pores de très faibles dimensions, elle est protégée des dégradations ultérieures et de la minéralisation par les bactéries (Six *et al.*, 2004 ; Dommergues & Mangenot, 1970). L'adsorption des matières organiques à des surfaces minérales, comme les argiles, affecte également leur disponibilité vis-à-vis des microorganismes du sol.



#### II.4.2.v. Nature du sol

Le sol est une couche meuble de la croûte terrestre. Il est constitué de différents éléments : la fraction minérale, produit de l'altération de la roche-mère, et la fraction organique (ou humus), composée de matière carbonée issue de la dégradation des composés végétaux et animaux. Le type de sol est très variable en fonction de la nature et de la quantité de chacun de ses éléments (Figure 3 ; Kemper & Rosenau, 1986). La texture du sol dépend de la composition relative en argiles, limons et sables (Figure 4). Structure et texture déterminent les capacités de transferts et de survie des bactéries fécales puisqu'à un type de sol sont associés des caractéristiques physicochimiques particulières.

La texture des sols influence la survie d'*E. coli*, notamment par sa teneur en argiles. Un sol riche en argile contient plus de microhabitats et suffisamment d'eau, de nutriments et de sites protecteurs contre la prédation, favorisant ainsi la survie des bactéries et leur protection (Cools *et al.*, 2001). Les argiles sont des minéraux siliceux, de diamètre inférieur à 2 µm, avec une forte réactivité de surface. Les minéraux argileux sont associés à des cations minéraux et des molécules organiques (formation de complexe argilo-humique) par adsorption (Vanveen & Kuikman, 1990). Les argiles ont un effet protecteur reconnu sur les composés organiques auxquels elles sont associées. L'oxydation des acides humiques est en effet limitée par la présence de certains types d'argiles dans le milieu. Toutes les argiles n'ont également pas les mêmes propriétés d'adsorption. La montmorillonite est très active en terme d'adsorption, la kaolinite l'est peu et, l'argile dominante des sols tempérés, l'illite, a une position intermédiaire (Dommergues & Mangenot, 1970). Ce sont donc des constituants du sol très importants pour la survie des populations bactériennes, dont *E. coli*, grâce à leurs propriétés d'adhésion et à la protection physique que les argiles procurent aux cellules bactériennes notamment vis-à-vis des protozoaires (voir II.4.3) (Oliver *et al.*, 2007 ; Davies *et al.*, 1995). Cette protection physique vis-à-vis des protozoaires est liée à l'adsorption et à la formation d'agrégats. Les bactéries indigènes du sol sont généralement incluses au sein d'agrégats alors que les bactéries récemment introduites sont plutôt protégées par adsorption directe sur les argiles. Ainsi, Recorbet *et al.* (1995) ont montré que près de 80 % des cellules d'*E. coli*, d'origine non environnementale, introduites dans un sol étaient principalement situées en surface des particules d'argile alors que 90 % des bactéries indigènes étaient incluses dans les agrégats. Une faible mortalité d'*E. coli* O157:H7 a également été montrée dans des sols insaturés à fort potentiel matriciel (Mubiru *et al.*, 2000). Les propriétés d'échange des argiles se traduisent par un pouvoir tampon qui atténue les variations de pH à leur proximité, favorisant ainsi le maintien des activités biologiques dans les sols

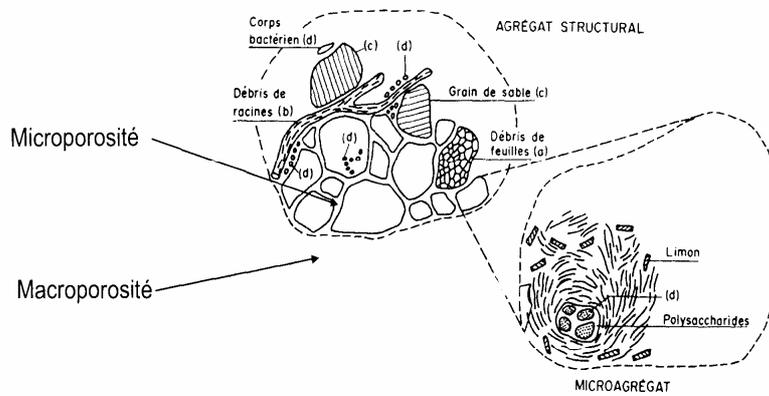


Figure 3 : Eléments de la structure d'un sol. D'après Duchaufour (1997)

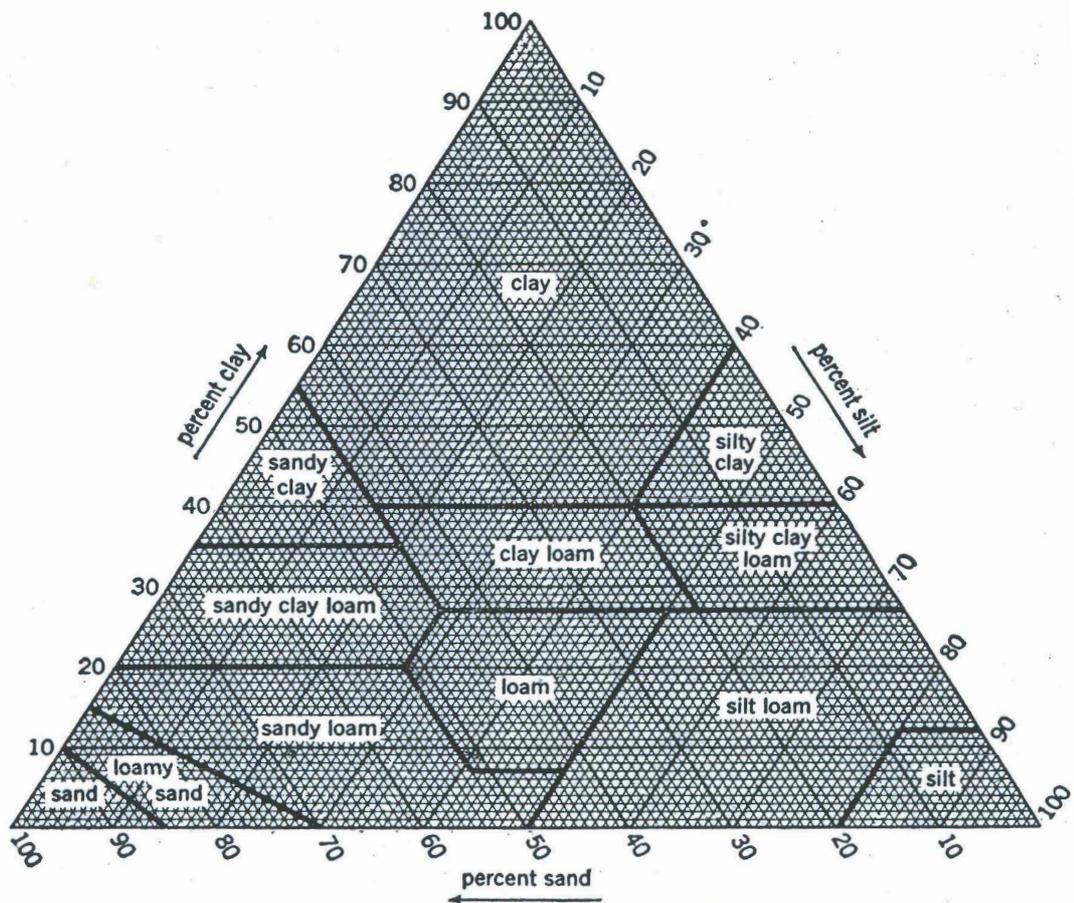


Figure 4 : Triangle de texture. Les particules d'argile sont inférieures à 0,002 mm, celles de limons comprises entre 0,002 et 0,05 mm et celles de sables entre 0,05 et 2,0 mm

(Dommergues & Mangenot, 1970). Ainsi, dans un sol limono-argileux, *E. coli* O157:H7 est capable de survivre 105 j, alors que sa durée de survie dépasse les 140 j dans des sols limoneux et des sols argileux (Ogden *et al.*, 2002 ; Fenlon *et al.*, 2000).

Pour évaluer la survie d'une souche d'*E. coli* non pathogène et d'une souche d'*E. coli* O157:H7, Mubiru *et al.* (2000) ont inoculé ces deux types de souches dans deux sols différents. Le premier était dominé par des limons grossiers avec une charge en cailloux importante, et le second par des limons fins. Dans le 1<sup>er</sup> sol, une mortalité des deux souches plus élevée a été observée. Dans le 2<sup>nd</sup> sol, la souche non pathogène présentait une meilleure survie. La présence de cailloux dans des sols explique ce phénomène puisqu'elle favorise l'infiltration des *E. coli* vers la profondeur (Hagedorn *et al.*, 1978). Par contre, si *E. coli* peut être transféré en profondeur, il y survit généralement moins qu'à -5 cm (Desmarais *et al.*, 2002 ; Faust, 1982 ; Chandler *et al.*, 1981). D'après Zhai *et al.* (1995), le taux de mortalité plus élevé en profondeur qu'en surface s'expliquerait par des différences de propriétés physicochimiques des différents horizons de sol, notamment par une plus faible disponibilité en azote, un pH plus acide, une humidité plus faible et enfin, par une quantité de matière organique moins forte. Le maintien d'*E. coli* en profondeur dépend également de l'activité biologique du sol. Comme précisé précédemment, les espèces de vers de terre présentes dans le sol déterminent le transport vertical et horizontal des bactéries dans le sol. Ainsi, de plus fortes concentrations en coliformes thermotolérants ont été montrées en profondeur (jusqu'à 80 cm) dans un sol sous pâture, riche en vers de terre, plutôt que dans un sol arable (Joergensen *et al.*, 1998). De plus, dans le 1<sup>er</sup> cas, la drilosphère de *L. terrestris* comporte plus de coliformes que le sol nu, la distribution d'*E. coli* étant assez homogène entre surface et profondeur du fait de la nature « exploratrice » de *L. terrestris* (Joergensen *et al.*, 1998). D'autre part, les cellules bactériennes, notamment *E. coli*, ont une meilleure adhérence aux particules d'argile et de limon qu'aux particules de sable (Guber *et al.*, 2007) et la porosité est déterminante vis-à-vis du transfert par l'eau. Dans des sols limonoargileux, une majorité des bactéries (65 %) est liée à des particules de faible diamètre (<2 µm), voire circule librement, ce qui a un impact notable sur la quantité de cellules transférées avec l'eau (Oliver *et al.*, 2007). C'est finalement la nature de la porosité et la vitesse des flux d'eau qui sont déterminantes, des flux lents et une porosité fine retenant mieux les coliformes et donc ne permettant pas un transfert plus en profondeur. C'est pourquoi des nombres plus élevés de coliformes fécaux ont été montrés dans des aquifères basaltiques, à porosité de fracture, que dans des aquifères à texture plus fine, mieux filtrés, qui stockent les bactéries dans la matrice sol (Entry *et al.*, 2001).



Ces études montrent l'importance de la matière organique et des argiles pour la survie des bactéries grâce à leur effet positif sur l'adsorption bactérienne (Mawdsley, 1995).

#### II.4.3. Facteurs de contrôle biotiques de la survie d'*E. coli*

Le sol n'est pas un environnement uniquement régi par les seuls paramètres physicochimiques évoqués ci-dessus. Il supporte une faune et une microflore particulières qui peuvent interagir avec les bactéries fécales introduites dans ce sol. Ainsi, quand *E. coli* pénètre dans le sol, il est soumis à tout un ensemble d'interactions négatives (compétition, antagonisme, prédation) avec la microflore tellurique et les protozoaires du sol.

##### II.4.3.i. Compétition et antagonisme avec la microflore tellurique

Quand *E. coli* pénètre dans le sol, il entre en compétition avec la microflore indigène pour l'occupation de microhabitats ou encore, pour l'accès aux nutriments et à l'eau. *E. coli* est capable d'utiliser le carbone organique d'un sol, même en présence de la microflore tellurique (Recorbet *et al.*, 1992). Cependant, cette dernière est plus apte à capter et à cataboliser les substrats nutritifs du sol (Byappanahalli *et al.*, 1998, 2004 ; Ellis & McCalla, 1978). *E. coli* présente également des propriétés d'adaptation plus faibles vis-à-vis de carences nutritionnelles que les bactéries telluriques (Byappanahalli *et al.*, 2004).

Des expérimentations basées sur l'inoculation de suspensions d'*E. coli* en sol stérile et non stérile mettent en évidence les phénomènes de compétition entre les microflores exogène et indigène. Lors d'inoculation en sol stérile, *E. coli* est susceptible de croître selon une courbe de croissance exponentielle (Abu-Ashour & Lee, 2000 ; Recorbet *et al.*, 1992). L'inoculation dans un sol non stérile n'aboutit pas à ce même résultat ; elle se traduit par une phase de déclin d'*E. coli* suivie d'une phase stationnaire dont la durée varie en fonction du type de sol et des conditions d'incubation, témoignant ainsi de l'action négative de la microflore indigène sur *E. coli*.

Les relations de compétition ne sont pas les seules à régir les interactions bactériennes dans le sol. Il existe aussi des phénomènes d'antagonisme puisque certaines bactéries produisent des antibiotiques qui inhibent la croissance d'autres populations microbiennes. Dans le sol, différentes espèces bactériennes sont capables d'en produire comme par exemple, *Streptococcus* spp. et certains *Pseudomonas*. Peu de données sont disponibles concernant



l'impact de ces antibiotiques sur la croissance d'*E. coli in situ*. Cependant, un antibiotique produit par certaines souches phytoprotectrices de *Pseudomonas fluorescens*, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), est connu pour inhiber la croissance d'une entérobactérie phytopathogène de la pomme de terre (*Pectobacterium carotovorum*) (Cronin *et al.*, 1997). Le DAPG pourrait donc être susceptible de réguler d'autres espèces d'entérobactéries comme *E. coli*. De plus, comme *Pseudomonas* est un acteur majeur de la flore naturelle des sols ( $10^6$  à  $10^8$  g<sup>-1</sup> de sol), il pourrait avoir un rôle important vis-à-vis du contrôle des niveaux de populations d'*E. coli* dans les sols.

#### II.4.3.ii. La prédation

Les protozoaires sont des organismes cellulaires eucaryotes dépourvus de paroi, mesurant entre 5 et 50 µm (contre 2 µm pour *E. coli*). Ils constituent un des facteurs les plus importants dans le contrôle des populations bactériennes (Tappeser *et al.*, 1998).

Ils sont détritivores mais interagissent également avec les populations bactériennes dans des systèmes de relations proie/prédateur. Ils régulent les niveaux de populations sans les anéantir complètement puisque pour survivre, les prédateurs requièrent un niveau de proies suffisant (Alexander, 1981).

Dans les sols à faible capacité de rétention en eau, les films d'eau sont discontinus ce qui restreint la circulation des protozoaires et, si le stress hydrique n'est pas limitant pour les communautés bactériennes-proies, augmente en retour le potentiel de survie de ces dernières (Heijnen & Vanveen, 1991). La structure des sols influence le taux d'humidité et les conditions d'oxygénation des sols et a donc un effet indirect sur les populations de protozoaires (Solo-Gabriele *et al.*, 2000 ; Griffiths & Young, 1994). L'activité des protozoaires diminue sensiblement en conditions d'anaérobiose, notamment dans des sols saturés (Griffiths & Young, 1994). De plus, les protozoaires ne peuvent accéder à la microporosité du sol à cause de leur taille. Les ciliés ne peuvent pénétrer dans les pores de taille inférieure à 20 µm, les amibes dans les pores de taille inférieure à 10 µm et les flagellés dans ceux de taille inférieure à 5 µm (Hattori & Hattori, 1976). Les cellules bactériennes logées dans des pores de faibles dimensions sont donc protégées vis-à-vis de la prédation (Young & Ritz, 2000).

Si les objets de faible dimension ne sont pas accessibles aux protozoaires, il en est de même avec ceux de grande taille. Ainsi, dans les sols argileux, les complexes formés par adsorption des bactéries sur les particules d'argile ne peuvent être ingérés par les protozoaires



lorsque leur taille est trop importante (England *et al.*, 1993). De même, la nature de l'argile peut être impliquée dans la protection physique de la proie vis-à-vis du prédateur. Ainsi, la montmorillonite, argile gonflante à faible capacité d'échange cationique, inhibe l'interaction *Bdellovibrio/E. coli* dans l'eau (Roper & Marshall, 1977). Teneurs en argile, matière organique et microporosité du sol favorisent donc l'existence d'un ensemble de niches protectrices vis-à-vis de phénomènes de prédation (Cools *et al.*, 2001 ; Gagliardi et Karns, 2000 ; Young et Ritz, 2000)

#### II.4.3.iii. Les protozoaires, réservoir de pathogènes ?

Parfois, les protozoaires peuvent agir comme réservoir de bactéries fécales pathogènes (Brown *et al.*, 2002 ; Barker *et al.*, 1999 ; England *et al.*, 1993). En présence de biocides et d'antibiotiques, les amibes peuvent servir de niches protectrices à *E. coli* O157:H7. Cette localisation intracellulaire favorise la survie d'*E. coli* O157:H7, sa dissémination, sa virulence ainsi que sa résistance aux biocides et antibiotiques (Barker *et al.*, 1999).

#### II.4.3.iv. Le parasitisme

Les bactériophages sont des virus parasitant les bactéries. Dans les sols, ils ont une concentration 10 fois plus élevée que les bactéries ( $10^7$  à  $10^8$  phage par g de sol) ce qui en fait un facteur important de régulation des populations bactériennes (Ashelford *et al.*, 2003). Ils présentent une grande spécificité d'hôte (Fischer *et al.*, 2004). Les phages peuvent altérer également les génotypes et les phénotypes des cellules bactériennes (Allison & Verma, 2000). Impliqués dans les transferts de gènes, les phages influent indirectement la survie d'*E. coli* (Marsh & Wellington, 1994). Argile et matière organique limitent la lyse phagique grâce à leur rôle protecteur vis-à-vis des cellules d'*E. coli* (England *et al.*, 1993).

Des populations d'*E. coli* commensales ou pathogènes sont susceptibles d'être retrouvées dans tous les compartiments constituant un bassin versant pâturé. Leur survie dans ces compartiments est sous le contrôle de facteurs biotiques et abiotiques. Les interactions existant entre bactéries indigènes, bactéries introduites, facteurs biotiques et facteurs abiotiques régulent les niveaux de populations d'*E. coli*. En réponse à ces interactions, *E. coli* peut mettre en place différentes stratégies de survie en modulant l'état physiologique dans lequel elle se trouve.



### III. Etat physiologique d'*E. coli* dans l'environnement

L'état physiologique d'*E. coli* est généralement décrit à partir d'observation basée sur la culture des microorganismes dans des milieux nutritifs spécifiques. Or, si *in vitro* les conditions rencontrées sont optimales pour la croissance bactérienne, dans l'environnement (*in situ* et *in vivo*), elles ne sont pas toujours favorables. Ainsi, *E. coli* a un temps de génération de 2 jours dans l'intestin (Savageau, 1983) et de 20 min à 37°C en milieu complexe riche Luria Bertani. Dans l'environnement, les bactéries sont confrontées à des carences nutritionnelles et à divers stress comme les stress osmotiques, acides, thermiques ou liés aux expositions à des ultraviolets (UV)..., pouvant affecter leur cultivabilité ou encore leur état physiologique. Les cellules semblent s'adapter morphologiquement et physiologiquement de la même façon face à un stress que lors de leur entrée en phase stationnaire de croissance (Ishihama, 1997). Les bactéries gram-positives comme *Bacillus* spp. mettent en place des stratégies de défense afin de survivre dans l'environnement. Elles se différencient sous la forme de spores, correspondant à des formes cellulaires inactives et résistantes (Stephens, 1998). Or les bactéries gram-négatives comme *E. coli*, et plus généralement les entérobactéries, sont asporulentes. Elles ont développé par contre d'autres stratégies de survie, telles que l'entrée dans un état viable (ou actif) mais non cultivable (VBNC/ABNC pour *Viable/Active But Not Culturable*) (Roszak & Colwell, 1987) ou l'organisation sous forme de biofilm, groupe complexe d'individus englobés dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS) et associé à une surface. Cette structure est connue entre autres pour sa tolérance aux antibiotiques grâce à la présence de cellules persistantes.

#### III.1. Croissance bactérienne *in vitro* et phase stationnaire

*In vitro*, la croissance bactérienne en milieu de culture liquide se déroule en 4 phases principales: (1) une phase de latence plus ou moins longue correspondant à une phase d'adaptation des cellules aux conditions qu'elles rencontrent, (2) une phase exponentielle de croissance durant laquelle le taux de division des cellules par scissiparité est maximal et reste constant et (3) une phase stationnaire pendant laquelle le métabolisme et le taux de division cellulaire ralentissent tandis que certaines cellules meurent par lyse cellulaire; un équilibre entre division et mortalité est alors atteint, suit ensuite (4) une phase de déclin pendant

Tableau 5 : Réponse de gènes connus, comme régulés dans le quorum sensing, à l'autoinducteur AI-2 chez *E. coli*. D'après DeLisa *et al.* (2001)

Quorum-regulated gene	Function or description	Fold increase
<i>ftsQ</i>	Cell division	1.1
<i>ftsA</i>	Cell division	1.0
<i>ftsZ</i>	Cell division	1.4
<i>sdiA</i>	Positive regulator of cell division	2.0
<i>rpoS</i>	Stationary phase sigma factor	1.2
<i>cysK</i>	O-acetylserine lyase A	1.5
<i>astD</i>	Putative succinylglutamate-semialdehyde dehydrogenase	1.3
<i>tnaB</i>	Glutamate:succinate semialdehyde aminotransferase	1.1
<i>gabT</i>	Low-affinity tryptophan permease	1.4

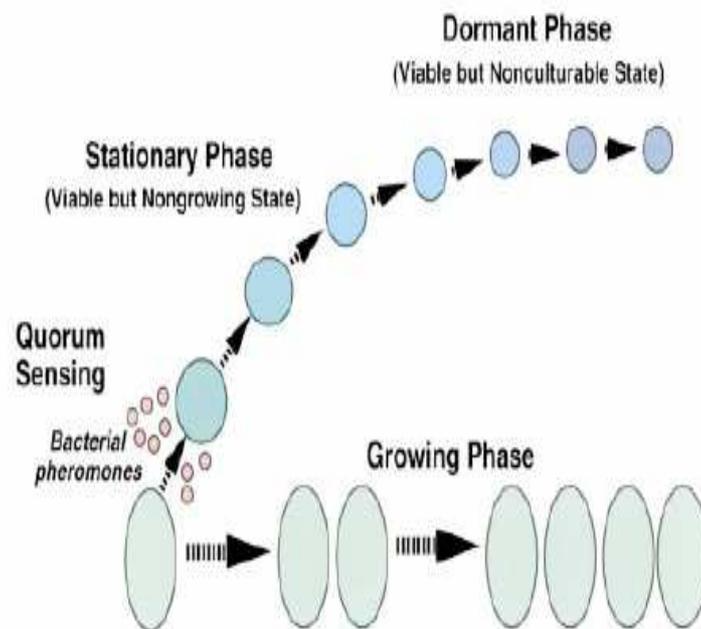


Figure 5 : Synthèse de phéromones impliquées dans la différenciation des cellules entrant en phase stationnaire de croissance. D'après Ishihama (1999)

laquelle le nombre de cellules qui meurent augmente suite à l'épuisement des ressources nutritives et l'accumulation de déchets.

Chez *E. coli*, le taux d'ARN ribosomiaux (ARNr) et de transfert (ARNt) est fortement corrélé au taux de croissance (Aviv *et al.*, 1996). A l'entrée en phase stationnaire, la synthèse *de novo* de ribosomes cesse et les cellules finissent leur cycle de réplication sans augmentation de biomasse ce qui se traduit par des modifications morphologiques : diminution de la taille des cellules, condensation cytoplasmique, condensation du chromosome, fluidification des membranes et augmentation de la capacité d'adhésion et d'agrégation. La capacité des cellules à capturer et à concentrer certains éléments nutritifs est augmentée, leur permettant ainsi de supporter des carences nutritionnelles prolongées. Elles vont également acquérir des propriétés de résistance vis-à-vis d'agents physiques ou chimiques auxquels elles sont sensibles en phase exponentielle de croissance (Makinoshima *et al.*, 2002 ; Loewen *et al.*, 1998 ; Roszak & Colwell, 1987a). Dans une culture, il est possible de différencier des populations cellulaires de différentes densités en fonction de leur phase de croissance (Makinoshima *et al.*, 2002). La mise en place de ces modifications morphologiques implique l'expression d'un programme génétique particulier sous la dépendance de différents facteurs globaux de régulation dont le facteur sigma *rpoS* (que nous décrirons dans le paragraphe concernant la description des marqueurs génétiques de l'état physiologique d'*E. coli*).

En milieu de phase exponentielle de croissance, les cellules d'*E. coli* synthétisent une phéromone, semblable à l'autoinducteur AI-2 produit par *Vibrio harveyi*, leur permettant de communiquer entre elles et de réguler l'expression de gènes en fonction de la densité cellulaire de la population. Ce système de communication intercellulaire est appelé Quorum Sensing (ou QS) (Surette *et al.*, 1999 ; Surette & Bassler, 1998). AI-2 s'accumule dans le milieu jusqu'à l'entrée en phase stationnaire puis est dégradée. Le gène *luxS* est impliqué dans sa synthèse (Surette *et al.*, 1999) tandis que les gènes *sdiA* et  $\sigma^{54}$  seraient impliqués dans la régulation de l'expression des gènes en réponse à AI-2 (DeLisa *et al.*, 2001). Les gènes régulés par QS chez *E. coli* régissent les processus de division cellulaire, de morphogénèse, et de synthèse d'exo et lipo-polysaccharides (Tableau 5 ; DeLisa *et al.*, 2001). Ce système de communication est ainsi impliqué dans la régulation de la différenciation des cellules lors de leur entrée en phase stationnaire (Figure 5). Cette régulation de la différenciation de la morphologie cellulaire par QS chez *E. coli* est très particulière par rapport à ce qui est classiquement décrit chez d'autres microorganismes (Withers & Nordstrom, 1998).



Hormis la souche DH5 $\alpha$ , toutes les souches d'*E. coli*, qu'elles soient commensales ou pathogènes, sont capables de synthétiser cette molécule signal ainsi que *Salmonella typhimurium*.

Dans le cas particulier d'*E. coli* O157:H7, le QS contrôle négativement via la protéine SdiA l'expression des facteurs de virulence (Kanamaru *et al.*, 2000).

## III.2. Mécanismes de survie des bactéries dans l'environnement

### III.2.1. L'état viable mais non cultivable

Toutes les cellules bactériennes présentes dans l'environnement ne sont pas cultivables sur les milieux de culture classiquement utilisés en laboratoire. Parmi ces cellules, certaines sont mortes mais d'autres sont viables. La distinction entre ces deux types de cellules se fait sur la base de la détection de leur intégrité cellulaire et de leur fonctionnalité ou de leur élongation cellulaire (Villarino *et al.*, 2000). Basées sur ces différences, des méthodes de marquage moléculaire ont été mises au point pour détecter la non-cultivabilité des cellules. L'ADN peut être marqué soit dans les cellules vivantes soit dans les cellules mortes. Ainsi, la coloration au DAPI (diamidino-4',6-phénylindol-2-dichlorhydrate) marque l'ADN de toutes les cellules, mortes ou vivantes tandis que celle au iodure de propidium, l'ADN des cellules mortes car seules les membranes altérées le laisse pénétrer. Une autre méthode consiste en la combinaison entre l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH pour *Fluorescent In Situ Hybridization*) et le comptage direct des cellules viables (DVC pour *Direct Viable Count*). On appelle cette technique la DVC-FISH. La FISH est utilisée pour détecter les ARN ribosomiaux. En parallèle, le DVC marque l'élongation cellulaire, ce qui permet une meilleure discrimination des cellules vivantes et des cellules mortes (Oliver, 2005 ; Regnault *et al.*, 2000 ; Villarino *et al.*, 2000 ; Porter *et al.*, 1995).

Bien qu'elles conservent leur intégrité cellulaire, les cellules VBNC présentent un faible niveau d'activité métabolique, un profil protéique différent des cellules cultivables ainsi qu'un changement dans la composition des peptidoglycanes de la paroi cellulaire (Oliver, 2005 ; Signoretto *et al.*, 2002). Dans l'environnement, les cellules peuvent rester plus d'une année dans cet état (Bunker *et al.*, 2004). En fait, les bactéries rentrent en état VBNC en présence de conditions environnementales défavorables telles que des températures éloignées de celle optimale pour leur croissance, de fortes concentrations salines ou encore, des carences nutritionnelles (Winfield & Groisman, 2003).

Tableau 6 : Espèces bactériennes dont l'état VBNC a été décrit. D'après Oliver (2005)

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
	<i>M. smegmatis</i>	
<i>C. lari</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. natrigens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>R. meliloti</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1&2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>S. typhi</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>	
<i>K. planticola</i>		

Différentes espèces bactériennes sont connues comme entrant en état VBNC et notamment de nombreux pathogènes dont le sérotype *E. coli* O157:H7 mais également des souches non pathogènes comme *E. coli* K12 (Tableau 6 ; Na *et al.*, 2006 ; Oliver, 2005 ; Mizunoe *et al.*, 1999 ; Kogure & Ikemoto, 1997). La réversibilité d'un état VBNC a été démontrée *in vitro*, *in vivo* et *in situ* (Na *et al.*, 2006 ; Oliver, 2005 ; Oliver & Bockian, 1995) mais cette question fait débat. En effet, pour McDougald *et al.* (1998), les cellules VBNC présentent, suite à une carence nutritionnelle ou à un stress prolongé, des caractéristiques phénotypiques incompatibles avec un retour dans un état cultivable (perte d'intégrité cellulaire, dégradation des acides nucléiques). A l'opposé, Makino *et al.* (2000) ont montré qu'une incubation dans un milieu contenant un bouillon d'extrait de levure permettait le retour à la cultivabilité de 90 % des cellules viables d'une culture d'*E. coli* O157:H7.

Suite à un stress oxydatif, 60 % des cellules d'*E. coli* en phase stationnaire de croissance entrent en état VBNC (Desnues *et al.*, 2003). Deux groupes de populations se distinguent en fonction de leur densité et ne présentent pas les mêmes proportions des cellules VBNC. La 1<sup>re</sup> sous-population, présentant des cellules de forte densité (HD, pour *High Density*), contiendrait une forte proportion de cellules VBNC. La 2<sup>de</sup> sous-population serait composée de cellules de plus faible densité (LD, pour *Low Density*) et majoritairement cultivables (pour 90% d'entre elles). Les cellules VBNC présenteraient le même transcriptome que les cellules cultivables en phase stationnaire de croissance mais leur expression protéique diffère (Cuny *et al.*, 2005). Par exemple, la protéine SurA, impliquée dans la survie en phase stationnaire, a un taux de traduction trois fois plus élevée au sein de la sous-population HD. La cultivabilité des cellules de la sous-population HD serait plus sensible à la carence en phosphate, au choc thermique et au stress oxydatif que la sous-population LD. Ces cellules HD résisteraient donc moins aux stress que la sous-population LD et entreraient plus facilement en état VBNC, qui correspondrait donc à un état physiologique mis en place en réponse à un stress. Elles présentent d'ailleurs un plus fort taux de mortalité et pourraient servir de nutriments aux cellules LD. Ainsi, au sein d'une même culture bactérienne, la sensibilité des cellules cultivables diffère et les cellules n'ont donc pas toutes les mêmes capacités de résistance aux stress, cette disparition sélective permettant de sélectionner les populations bactériennes capables de résister aux conditions de stress.

Si les cellules viables mais non cultivables peuvent être détectées avec des méthodes moléculaires, elles peuvent aussi l'être à partir de méthodes enzymatiques. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser le terme « actives mais non cultivables » (ABNC) au lieu de VBNC

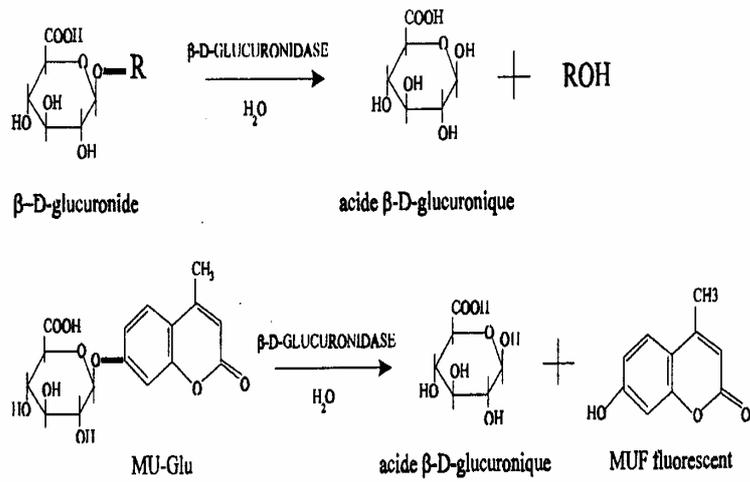


Figure 6 : Hydrolyse des  $\beta$ -D-Glucuronides et du MU-Glu par la  $\beta$ -D-Glucuronidase. Les liaisons hydrolysées par l'enzyme sont figurées en gras.

même si la question est sujette à controverse (Kell *et al.*, 1998). Ces tests sont basés sur l'utilisation de substrats enzymatiques chromogènes ou fluorogènes (Garcia-Armisen *et al.*, 2005 ; Manafi *et al.*, 1991). L'hydrolyse du 4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide (MU-Glu) par la  $\beta$ -D-glucuronidase, à 44°C et pH 6,9, est utilisée pour détecter *E. coli*. Cette hydrolyse conduit à la formation de 4-méthylumbellifère (MUF), un composé fluorescent, détectable sous UV à 366 nm (Figure 6 ; George *et al.*, 2000). Dans certaines études sur eaux de mer, douces, ou usées, des mesures directes de l'activité  $\beta$ -D-glucuronidase ont été effectuées pour évaluer les concentrations en *E. coli* dans l'environnement en s'affranchissant des étapes de cultures (George *et al.*, 2000, 2001, 2002 et 2004 ; Caruso *et al.*, 2002 ; Farnleitner *et al.*, 2001 et 2002 ; Fiksdal *et al.*, 1994). Dans les eaux douces, les niveaux d'activité  $\beta$ -D-glucuronidase et d'effectifs en *E. coli* sont bien corrélés, ainsi que le niveau d'activité et le nombre d'*E. coli* actives (Garcia-Armisen *et al.*, 2005 ; Farnleitner *et al.*, 2001). Par contre, la détection de bactéries viables a mis en évidence que les effectifs d'*E. coli* étaient sous-estimés par les méthodes de culture et donc a révélé la présence de cellules non cultivables (Garcia-Armisen *et al.*, 2005 ; George *et al.*, 2000). Garcia-Armisen *et al.* (2005) ont, par ailleurs, montré que la différence existant entre nombre de bactéries cultivables et nombre de bactéries actives cultivables et non cultivables diminuait dans le cas de fort taux de contamination des eaux. La plus forte proportion des cellules ABNC dans les eaux faiblement contaminées pourrait s'expliquer par des conditions environnementales stressantes comme la dilution des nutriments ainsi qu'une profonde infiltration des rayonnements UV dans les eaux faiblement contaminées, limitant le nombre d'*E. coli* cultivables et induisant l'apparition de cellules plus résistantes de type ABNC.

L'entrée en état VBNC/ABNC est donc une réponse physiologique génétiquement programmée, induite pour favoriser la survie des bactéries face à des conditions environnementales défavorables. Cet état physiologique est généralement décrit comme n'affectant pas la virulence des souches pathogènes et poserait ainsi un sérieux problème de santé publique puisque l'évaluation des risques sanitaires est basée sur la détection des bactéries viables sur des milieux de culture et ne prend pas en compte ces cellules VBNC (Makino *et al.*, 2000 ; Mizunoe *et al.*, 1999). Néanmoins, Smith *et al.* (2002) ont montré que des souches de *S. enterica serovar typhimurium* entrant en état ABNC ne sont pas capables d'infecter la souris. L'influence de l'entrée des cellules à l'état non cultivable sur la virulence reste donc encore à étudier.

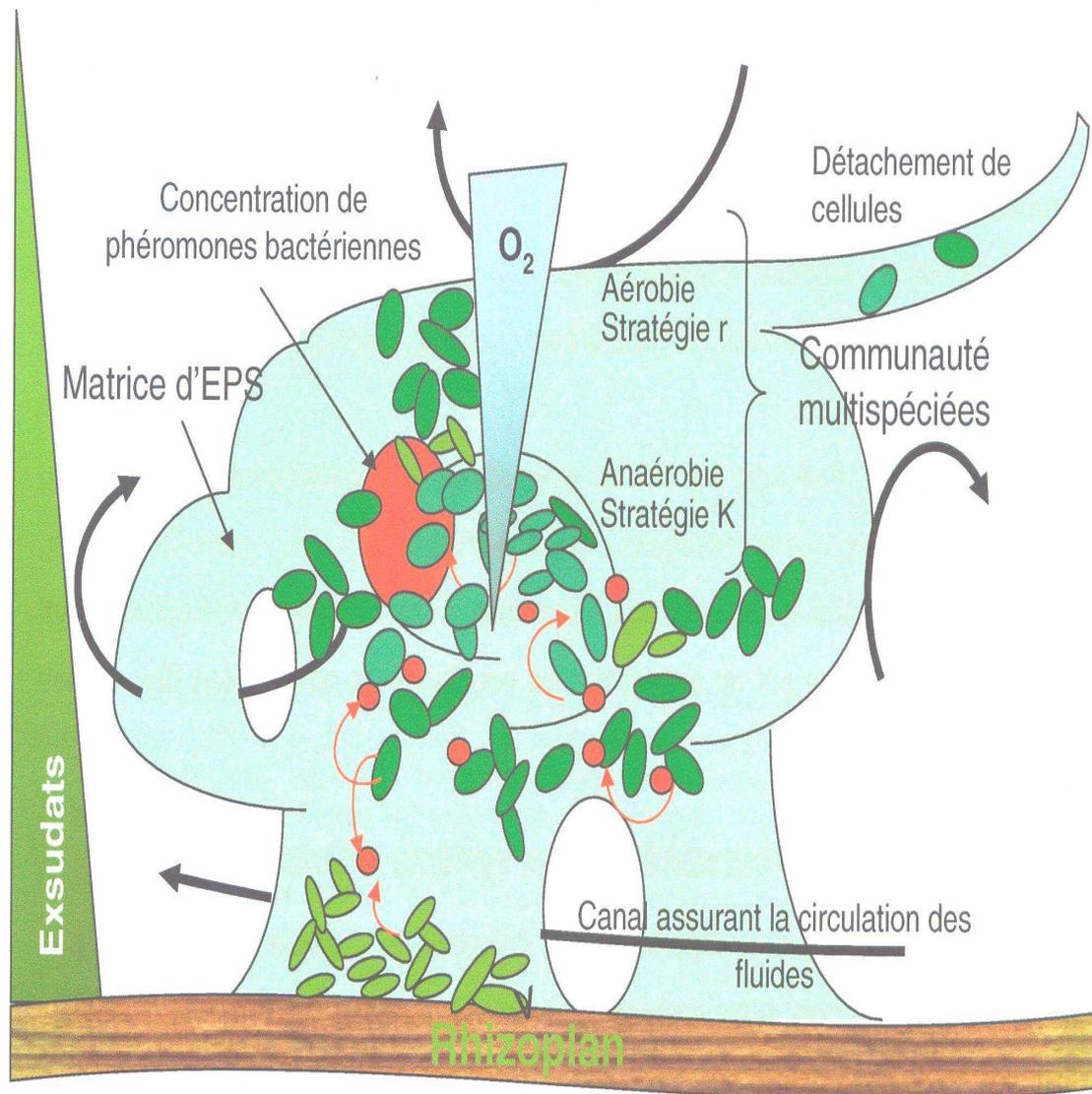


Figure 7 : Représentation schématique de la structure du biofilm rhizosphérique

### III.2.2. La vie en biofilm

Dans les environnements naturels, les bactéries s'organisent souvent en un groupe complexe d'individus englobé dans une matrice d'EPS et attaché à une surface. Cette structure est nommée biofilm (Watnick & Kolter, 2000). On peut trouver des biofilms attachés à la surface des racines et feuilles des plantes, à la surface des cailloux, dans les sédiments, sur les particules minérales de sols, à l'intérieur des canalisations et, en relation avec des pathologies humaines, dans la cavité buccale (caries dentaires), à la surface des tissus cardiaques (endocardites), à l'intérieur des cathéters, etc. La Figure 7 propose une représentation schématique d'un biofilm se développant à la surface de racines (biofilm rhizosphérique).

Les bactéries organisées en biofilms sont généralement plus résistantes aux stress environnementaux que celles à l'état planctonique.

Au sein d'un biofilm, une grande hétérogénéité physiologique existe avec des gradients d'oxygène (zones d'aérobiose et zones d'anaérobiose), de nutriments, de pH et d'osmolarité. La structure du biofilm évolue au cours du temps (initiation, maturation puis dispersion) (Ghigo, 2003). Les bactéries doivent donc mettre en place des systèmes de régulation particuliers pour développer une telle structure. Environ 2 % des gènes d'*E. coli* sont différemment exprimés dans les cellules en biofilm par rapport aux cellules planctoniques en phase exponentielle de croissance (1% des gènes chez *Pseudomonas aeruginosa* ; Whiteley *et al.*, 2001). Par contre, un ensemble spécifique de gènes s'expriment d'une façon comparable à la fois en phase stationnaire de croissance et dans les biofilms matures comme le facteur de transcription *rpoS*, qui a un rôle central dans la formation du biofilm (Beloin *et al.*, 2003 ; Schembri *et al.*, 2003 ; Watnick & Kolter, 2000 ; Tableau 7 ; Figure 8). La description de ce gène sera faite au chapitre III.2.4. Les mécanismes génétiques impliqués dans la formation des biofilms chez *E. coli* ont été très largement étudiés (liste non exhaustive : Schembri *et al.*, 2003 ; Prigent-Combaret *et al.*, 1999, 2000, 2001 ; Danese *et al.*, 2000 ; Prigent-Combaret et Lejeune, 1999 ; Pratt et Kolter, 1998 ; Genevaux *et al.*, 1996) mais n'entrent néanmoins pas dans le cadre de cette synthèse.

### III.2.3. Les cellules persistantes

Il est très difficile d'éliminer les biofilms du fait de leur forte tolérance à une large gamme de traitements antimicrobiens dont les antibiotiques. Quelque soit la nature de l'antibiotique ( $\beta$ -lactamases comme l'ampicilline qui ciblent les cellules à croissance rapide ou

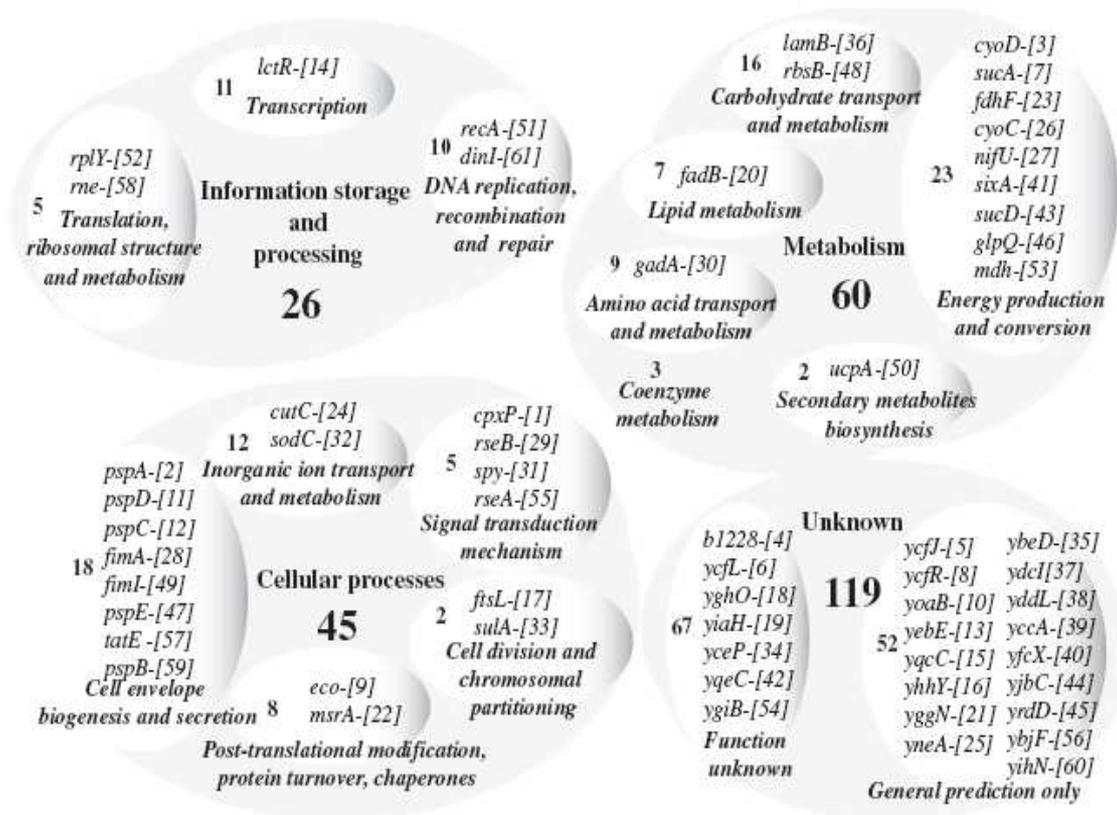


Figure 8 : Gènes fonctionnels surexprimés dans les cellules du biofilm par rapport aux cellules en phase exponentielle. D'après Beloin *et al.* (2003)

Tableau 7 : Ratios d'expression de groupes fonctionnels de gène dans les cellules du biofilm par rapport aux cellules planctoniques en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. D'après Schembri *et al.* (2003)

Functional group	Total	Number of genes <sup>a</sup>			
		Biofilm versus exponential		Biofilm versus stationary	
		Higher in biofilm	Lower in biofilm	Higher in biofilm	Lower in biofilm
Whole genome	4290	206	27	389	192
Amino acid biosynthesis	97	0	0	45	0
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	106	0	0	20	1
Carbon compound catabolism	124	7	0	5	6
Cell processes	170	12	2	15	11
Cell structure	85	5	1	9	0
Central intermediary metabolism	149	5	5	32	4
DNA replication, repair, restriction/modification	105	0	0	6	2
Energy metabolism	136	24	1	28	4
Fatty acid and phospholipids metabolism	41	1	0	6	1
Hypothetical, unclassified, unknown	1428	74	2	46	94
Nucleotide biosynthesis and metabolism	66	2	1	22	3
Phage, transposon or plasmid	91	2	0	2	2
Putative cell structure	438	1	0	0	2
Putative enzymes	453	25	2	28	21
Putative factors	67	3	0	1	4
Putative membrane proteins	54	1	0	3	3
Putative regulatory proteins	167	8	0	3	4
Putative transport proteins	291	18	3	14	11
Regulatory function	208	5	4	13	7
Transcription, RNA processing and degradation	28	0	0	3	0
Translation and post-translational modification	128	1	2	53	2
Transport and binding proteins	254	12	4	35	10

a. Number of genes showing significant ( $P < 0.05$ ,  $t$ -test;  $P < 0.03$ , Mann-Whitney test) expression fold ratios ( $\geq \pm 2.5$ ).

fluoroquinolones comme l'ofloxacine qui ciblent les cellules en dormance), ce dernier diffuse plus ou moins facilement à l'intérieur du biofilm et la résistance du biofilm est toujours 100 à 1000 fois supérieure aux doses létales (Lewis, 2005). Cette forte tolérance des biofilms serait due à l'existence de cellules persistantes, spécialisées dans la tolérance aux antibiotiques (Keren *et al.*, 2004). Les cellules persistantes sont également produites par des cultures de cellules planctoniques entrant en phase stationnaire de croissance. Les cellules en phase stationnaire présentent une plus forte tolérance aux antibiotiques que les cellules en biofilms et la proportion de cellules persistantes y est plus élevée (Keren *et al.*, 2004). *In vivo*, un traitement antibiotique élimine les cellules planctoniques mais laisse intactes les cellules persistantes du biofilm. Ces cellules sont facilement repérables : elles ont un taux de croissance faible et sont non mobiles car elles n'expriment pas de flagelles (Shah *et al.*, 2006). La production des cellules persistantes est dépendante de la phase de croissance et inversement dépendante de l'activité métabolique (Lewis, 2005 ; Balaban *et al.*, 2004 ; Keren *et al.*, 2004). En phase de latence et en début de phase exponentielle, la taille de la population bactérienne augmente mais pas le nombre de cellules persistantes. Par contre, à partir du milieu de la phase exponentielle de croissance et jusqu'à l'entrée en phase stationnaire, le nombre de cellules persistantes augmente avec le nombre de cellules totales (Balaban *et al.*, 2004 ; Keren *et al.*, 2004). Au final, ces cellules spécialisées représentent 0,001% des cellules d'une culture (Balaban *et al.*, 2004).

L'utilisation d'une puce d'expression, ciblant 4440 cadres ouverts de lecture d'*E. coli*, a mis en évidence la présence de gènes plus ou moins exprimés dans les cellules persistantes par rapport aux cellules d'une culture dans différentes phases de croissance (Shah *et al.*, 2006). Dans des cellules en phase exponentielle, 5 % des gènes s'expriment différemment dans les cellules persistantes : 45 gènes voient leur expression augmenter et 5 gènes sont réprimés. Dans des cellules en phase stationnaire, 420 gènes sont surexprimés dans les cellules persistantes (dont le gène *fis*, normalement principalement exprimé en phase exponentielle de croissance, voir le sous-chapitre III2.4.) et le même nombre de gènes est réprimé (dont le gène *rmf*, normalement exprimé en phase stationnaire de croissance, voir le sous-chapitre III2.4.). Ainsi, du point de vue de l'expression génétique, les cellules persistantes semblent plus proches des cellules en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de croissance.

Cet état persistant serait un 3<sup>ème</sup> état physiologique distinct des phases exponentielle et stationnaire de croissance. Ces cellules spécialisées constituaient, jusqu'à leur découverte, le



chaînon manquant pour comprendre la tolérance des biofilms aux agents antimicrobiens (Shah *et al.*, 2006 ; Balaban *et al.*, 2004 ; Keren *et al.*, 2004 ; Falla et Chopra, 1998).

L'état physiologique des bactéries (état cultivable ou non-cultivable, état de division ou de dormance) dépend d'une régulation fine de l'expression de certains gènes clés, impliqués notamment dans la division cellulaire et le contrôle de la transcription et de la traduction. Ces gènes pourraient servir de marqueurs moléculaires de l'état physiologique d'*E. coli* dans l'environnement.

#### III.2.4. Les marqueurs génétiques de l'état physiologique des *E. coli* dans l'environnement

Si certains gènes sont constitutivement exprimés tout au long de la croissance bactérienne, d'autres sont spécifiquement exprimés en fonction des différentes phases de croissance (Patten *et al.*, 2004 ; Azam *et al.*, 1999). Ainsi, chez *E. coli*, environ 1000 gènes sont fortement exprimés en phase exponentielle de croissance, alors que seulement 50 à 100 gènes s'expriment spécifiquement après l'entrée des cellules bactériennes en phase stationnaire (Ishihama, 1997). Une cascade de régulation génique complexe est activée lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Makinoshima *et al.*, 2002). Différents travaux, utilisant des puces d'expression, se sont intéressés à l'expression différentielle de gènes en phase stationnaire et en phase exponentielle de croissance (Travers & Muskhelishvili, 2005 ; Selinger *et al.*, 2000). D'autres études ont testé leurs expressions dans différentes conditions de culture (Wei *et al.*, 2001 ; Tao *et al.*, 1999). L'analyse bibliographique de l'expression de certains gènes en fonction des phases exponentielle et stationnaire de croissance a permis d'attirer notre attention sur 6 gènes d'intérêt s'exprimant différemment en fonction de l'état physiologique d'*E. coli* ou en réponse à certaines conditions environnementales.

##### III.2.4.i. Marqueurs de division et de phase exponentielle de croissance

###### III.2.4.i.1. *RpoZ*, la sous-unité $\omega$ de l'ARN polymérase

Le gène *rpoZ* (91 acides aminés ; Gentry & Burgess, 1986) code la sous-unité  $\omega$  de l'ARN polymérase. Chez *E. coli*, le gène *rpoZ* agit comme un activateur transcriptionnel en se liant à l'ADN (Dove & Hochschild, 1998). Lors d'état de carence *in vitro*, ce gène serait

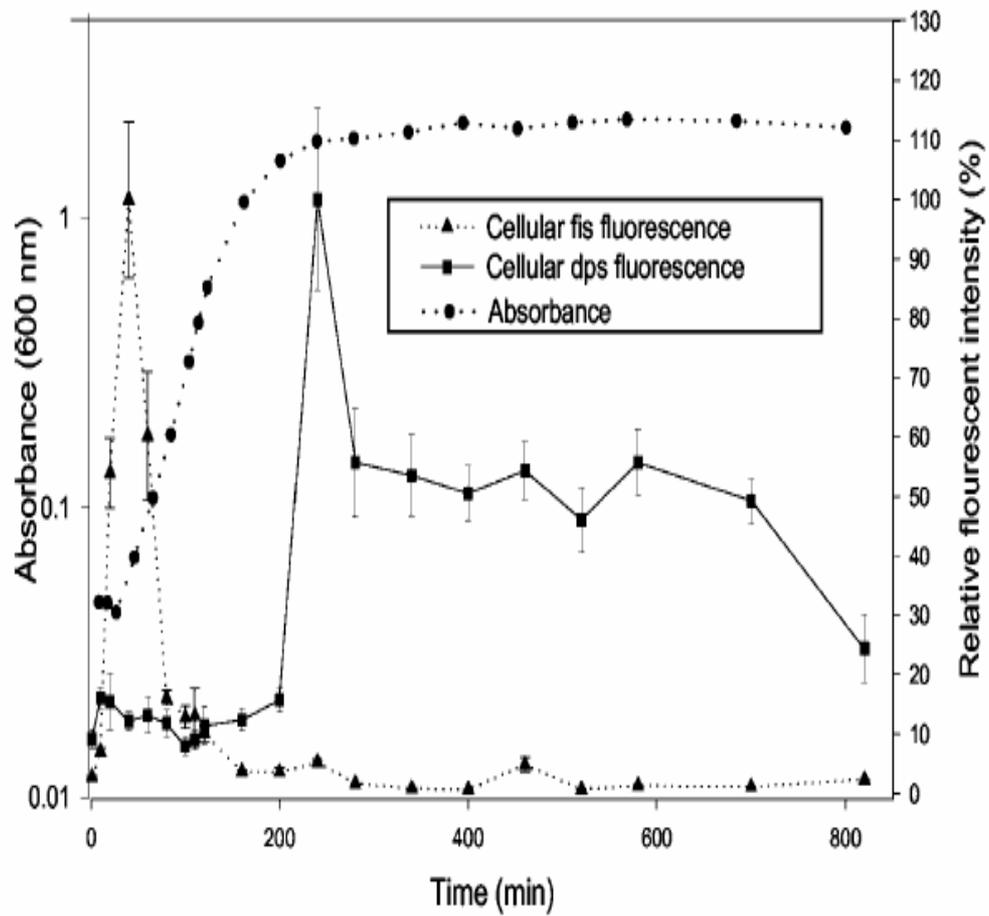


Figure 9 : Transcription des gènes *fis* et *dps* au cours de la croissance d'*E. coli* analysée par FISH. D'après Chen *et al.* (2004)

impliqué dans la régulation de gènes cibles en réponse au ppGpp (guanosine 3',5'-bisdiphosphate), une molécule signal de la réponse stringente (Igarashi *et al.*, 1989). La réponse stringente fait référence à la capacité d'une bactérie à diminuer la synthèse de ses ARNt et de ses ribosomes dans un milieu oligotrophe, qui correspond à un stress pour les bactéries hétérotrophes telles qu'*E. coli*.

La quantité de transcrit du gène *rpoZ* est maximale à l'entrée en phase exponentielle de croissance et nulle à l'entrée en phase stationnaire (Travers & Muskhelishvili, 2005).

#### III.2.4.i.2. *Fis*, une protéine de liaison à l'ADN

Le gène *fis* (*Factor of Inversion Stimulation*) code une protéine de liaison à l'ADN qui joue un rôle déterminant dans la coordination de la synthèse des ARNr avec la croissance bactérienne (Nilsson *et al.*, 1992). Cette protéine est impliquée dans l'initiation de la réplication du chromosome puisqu'elle se lie à l'origine de réplication *oriC* (Filutowicz *et al.*, 1992). C'est un régulateur positif qui augmente de 5 à 10 fois la transcription des gènes codant des ARNr (Gosink *et al.*, 1993; Newlands *et al.*, 1992). Elle régule donc la traduction de nombreux gènes en phase exponentielle de croissance mais également réprime l'expression de gènes spécifiques de la phase stationnaire (Zhang & Bremer, 1996 ; Bokal *et al.*, 1995 ; Ball *et al.*, 1992). Ainsi, *Fis* intervient dans la régulation du métabolisme général d'*E. coli* (González-Gil *et al.*, 1996).

La quantité de transcrit du gène *fis* augmente fortement durant la phase exponentielle de croissance (jusqu'à 1000 fois) et devient indétectable en phase stationnaire (Azam *et al.*, 1999 ; Rockabrand *et al.*, 1999). Le gène *fis* est autorégulé négativement, c'est-à-dire qu'à partir d'une certaine concentration de protéines *Fis* (entre 50000 et 100000 copies par cellule), celle-ci empêche la transcription de son propre gène. Une augmentation rapide de la concentration de l'ARNm *fis* est ainsi observée en début de phase exponentielle suivie d'une rapide diminution (Chen *et al.*, 2004 ; Figure 9). Il faut noter que ce type d'expression transitoire de *fis* est unique chez *E. coli* (Mallik *et al.*, 2004 ; Ball *et al.*, 1992).

#### III.2.4.i.3. *FtsZ*, responsable de la formation de l'anneau de septation

Le produit du gène *ftsZ* est responsable de la formation de l'anneau de septation au début de la division cellulaire (Dai & Lutkenhaus, 1991). La protéine *FtsZ* est vitale pour la



survie de la cellule. En effet, l'inactivation du gène *ftsZ* aboutit à la mort des cellules et sa surexpression provoque la formation de cellules anormalement petites (Cam *et al.*, 1995 ; Dai & Lutkenhaus, 1991 ; Teather *et al.*, 1974).

La quantité de transcrite du gène *ftsZ* est maximale lors de l'initiation de la réplication du chromosome (Garrido *et al.*, 1993). Chez *E. coli*, la transcription de *ftsZ* est sensiblement induite par la phéromone AI2 (augmentation d'un facteur 1,4), impliquée dans la régulation génique par QS (DeLisa *et al.*, 2001)(voir chapitre III.1.).

### III.2.4.ii. Marqueurs de phase stationnaire

#### III.2.4.ii.1. *RpoS*, le facteur $\sigma^S$

Les facteurs sigma sont des facteurs qui s'associent à l'ARN polymérase pour permettre la transcription de gènes cibles. Ils sont particulièrement impliqués dans la régulation génique en réponse à des stress environnementaux. Chez *E. coli*, il existe 6 facteurs sigma différents impliqués dans la réponse à des stress particuliers :  $\sigma^N$  (ou  $\sigma^{54}$ ) lors de carence en azote,  $\sigma^H$  (ou  $\sigma^{32}$ ) lors de choc thermique,  $\sigma^E$  (ou  $\sigma^{24}$ ) lors de stress extracytoplasmiques,  $\sigma^F$  (ou  $\sigma^{28}$ ) pour la synthèse de flagelline, FecI (ou  $\sigma^{19}$ ) pour le transport citrate-dépendent du fer et enfin,  $\sigma^S$  (ou  $\sigma^{38}$ ) lors de carences nutritionnelles (notamment observées lors de l'entrée des cellules en phase stationnaire), de stress osmotiques ou acides (Lonetto et Gross, 1996 ; Wösten, 1998). Ces 6 facteurs sigma contrôlent des ensembles de gènes spécifiques (ou régulons) en réponse aux conditions environnementales précédemment citées tandis que le facteur  $\sigma^D$  (ou  $\sigma^{70}$ ) contrôle plus particulièrement l'expression des gènes de ménage (ou *housekeeping gene*) au cours de la phase exponentielle de croissance.

Le gène *rpoS*, codant le facteur  $\sigma^S$ , a été fortement étudié du fait de son rôle central dans la régulation génique en phase stationnaire et en réponse à des stress environnementaux (Desnues *et al.*, 2003 ; Rao et Kornberg, 1996). Le facteur  $\sigma^S$  contrôle, positivement ou négativement, l'expression de plus de 100 gènes impliqués dans différents mécanismes de survie cellulaire (Patten *et al.*, 2004 ; Ishihama, 1999 ; Lange & Hengge-Aronis, 1991, 1994). *RpoS* est également impliquée dans la résistance au stress en conditions aérobies (King & Ferenci, 2005). Cette protéine contribue à la résistance d'*E. coli* aux pH acides et, de façon plus modérée, aux pH basiques (Small *et al.*, 1994). Par réaction croisée avec le facteur  $\sigma^H$ , *RpoS* confère aussi une résistance au choc thermique (Muffler *et al.*, 1997). Elle intervient encore dans la régulation de la formation des biofilms puisque l'inactivation du gène *rpoS*

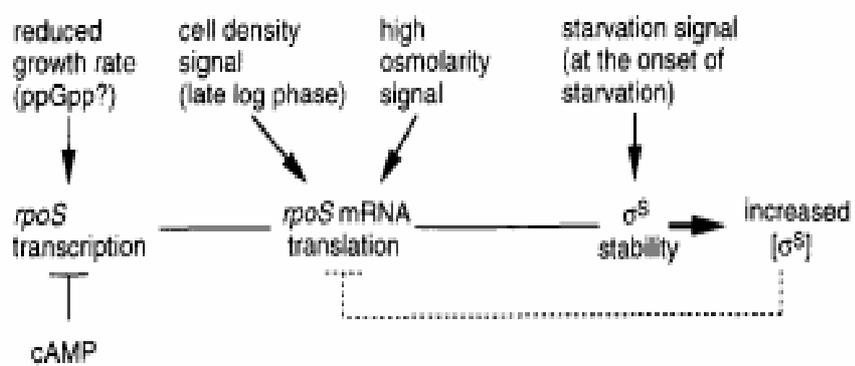


Figure 10 : Régulation transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle du facteur sigma S. D'après Lange et Hengge-Aronis (1994)

augmente la capacité des cellules d'*E. coli* en phase exponentielle de croissance à former des biofilms (Corona-Izquierdo & Membrillo-Hernandez, 2002). Chez *E. coli* O157:H7,  $\sigma^s$  est fortement impliqué dans l'acidotolérance de la souche pathogène *E. coli* O157:H7 mais également dans la résistance à la chaleur (55°C), aux chocs osmotiques et confère une plus grande résistance du pathogène aux hautes pressions que les souches commensales (400 MPa) (Robey *et al.*, 2001 ; Ferreira *et al.*, 1999 ; Cheville *et al.*, 1996 ; Arnold & Kaspar, 1995).

La synthèse de RpoS est régulée à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel ce qui correspond à l'un des systèmes de régulations le plus complexe chez les bactéries (Figure 10 ; Venturi, 2003). En milieu de culture, Lange & Hengge-Aronis (1991) avaient montré que la transcription de *rpoS* était multipliée par 5 à l'entrée en phase stationnaire. Or, il semblerait que l'augmentation de la concentration en protéine RpoS soit plutôt due à sa plus grande stabilité (avec une demi-vie de 27 min contre 4 min en milieu de phase exponentielle) (Zgurskaya *et al.*, 1997).

La concentration en protéine RpoS augmente sous certaines conditions environnementales telles que lors de stress oxydatifs, de chocs osmotiques, de stress acides et lors de carence en glucose ou en carbone ainsi que dans des cellules entrées en état VBNC suite à un stress oxydatif (Boaretti *et al.*, 2003 ; Desnues *et al.*, 2003 ; Venturi, 2003 ; Chang *et al.*, 2002 ; Castanie-Cornet *et al.*, 1999 ; Lange et Hengge-Aronis, 1994 ; Hengge-Aronis, 1993 ; McCann *et al.*, 1993 ; Notley *et al.*, 1996).

Lors de carence nutritionnelle, la synthèse du facteur  $\sigma^s$  est positivement régulée par la molécule signal de la réponse stringente, le ppGpp (Lange *et al.*, 1995 ; Gentry *et al.*, 1993). En phase exponentielle, *rpoS* s'exprime en réponse à de fortes osmolarités (Hengge-Aronis, 1993), à des températures inférieures aux températures optimales de croissance (par exemple dans une culture d'*E. coli* à 20°C, Sledjeski *et al.*, 1996). L'expression du gène *rpoS* est également régulée par QS puisque la phéromone AI2 augmente légèrement la transcription de *rpoS* d'un facteur 1,2 à 1,3 (DeLisa *et al.*, 2001).

#### III.2.4.ii.2. *Rmf*, responsable de la dimérisation des ribosomes

Le gène *rmf* code le facteur de modulation des ribosomes qui participe à leur dimérisation pour former le ribosome 100S, forme traductionnelle inactive (Figure 11). Cette inactivité des ribosomes est indispensable pour la survie de la cellule en phase stationnaire. Elle lui permet de stocker des ribosomes inutilisés sous une forme inactive. Cette forme

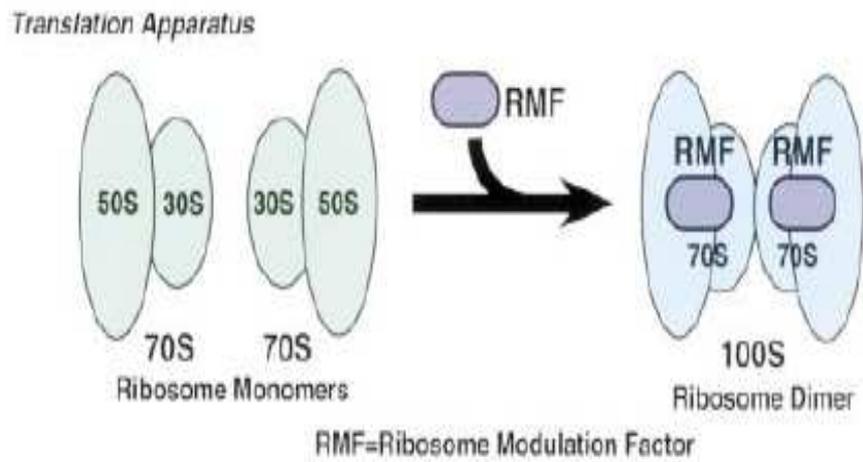


Figure 11 : Action de RMF, le facteur de dimérisation des ribosomes. D'après Ishihama (1999)

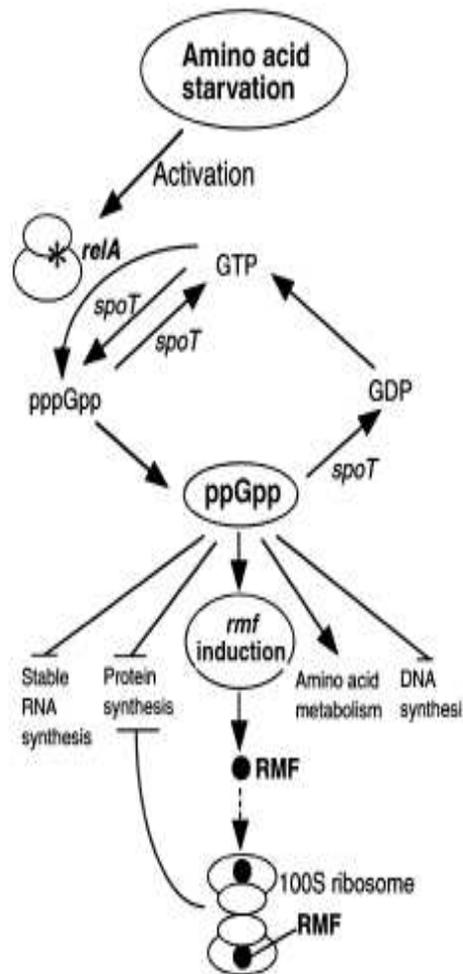


Figure 12 : Régulation de la synthèse de *rmf* lors de la réponse stringente. D'après Izutsu *et al.* (2001)

inactive des ribosomes les protège d'une dégradation par des protéases et nucléases dont la synthèse est fortement induite lors de la phase stationnaire (Ishihama, 1999).

Contrairement à de nombreux gènes, la transcription de *rmf* n'est pas contrôlée par le facteur  $\sigma^s$  (Izutsu *et al.*, 2001). Le taux de transcription de *rmf* est inversement proportionnel au taux de croissance. *rmf* n'est donc pas transcrit lors de la phase exponentielle. Par contre, lors d'une croissance lente ou dès l'entrée en phase stationnaire, la quantité de transcrit augmente fortement (Aiso *et al.*, 2005 ; Wada, 1998 ; Yamagishi *et al.*, 1993). L'activité du promoteur du gène *rmf* est maximale en phase stationnaire tardive (Makinoshima *et al.*, 2002). Lors de stress tels que lors de chocs acide, thermique et osmotique, la transcription de *rmf* augmente également en phase exponentielle de croissance (El-Sharoud & Niven, 2005 ; Niven, 2004). Dans ce cas, la synthèse accrue de Rmf n'aboutit pas à la formation de dimères de ribosomes mais permet de stabiliser les ribosomes et évite leur dégradation. Il faut préciser que ce n'est pas la synthèse de Rmf qui régule le taux de croissance bactérien mais bien le taux de croissance qui régule la synthèse de Rmf. Par exemple, dans le cas d'un choc acide, la diminution de pH entraîne une diminution du taux de croissance qui va, consécutivement, entraîner la synthèse de Rmf. Lors de la réponse stringente, l'augmentation de la concentration en ppGpp entraîne de façon directe une augmentation de la transcription de *rmf* (Figure 12 ; Izutsu *et al.*, 2001).

Il faut noter que le facteur Rmf n'est pas ubiquiste chez les bactéries. Des orthologues existent seulement chez quelques entérobactéries et quelques bactéries du sol.

#### III.2.4.ii.3. *Dps, une protéine de liaison à l'ADN*

Le gène *dps* code une protéine de liaison à l'ADN importante dans la réponse au stress en phase stationnaire (Lomovskaya *et al.*, 1994 ; Almiron *et al.*, 1992). *Dps* protège l'ADN vis-à-vis de molécules oxydantes, des nucléases et des rayons UV. Elle intervient également dans l'acidotolérance chez la souche pathogène *E. coli* O157:H7 (Choi *et al.*, 2000 ; Wolf *et al.*, 1999).

Sa transcription est 30 fois plus importante en phase stationnaire et durant des états de carence qu'en phase exponentielle (Shimada *et al.*, 2004 ; Makinoshima *et al.*, 2002 ; Azam *et al.*, 1999 ; Rockabrand *et al.*, 1999). L'abondance de la protéine *Dps* est utilisée comme témoin positif de non croissance. Une forte augmentation de la concentration cellulaire de *Dps* est en effet observé en début de phase stationnaire puis elle diminue pour se stabiliser à



un niveau toutefois supérieur à celui évalué en phase exponentielle (Chen *et al.*, 2004 ; Figure 9).

Le suivi de l'expression différentielle de ces 6 gènes en fonction des phases de croissance bactérienne pourrait permettre de tracer l'état physiologique des cellules d'*E. coli*. Cependant, si leur expression est bien décrite en milieu de culture, leur expression dans l'environnement n'est pas connue. De plus, les populations bactériennes sont rarement constituées d'un seul et unique clone. Au contraire, elles sont constituées d'un ensemble de clones présentant une diversité plus ou moins importante et un potentiel génétique variable, généralement dépendant de l'environnement considéré qui le sélectionne.

#### **IV. Diversité génétique des populations d'*E. coli***

##### **IV.1. Relations phylogénétiques infraspécifiques chez *E. coli***

Différents travaux de génomique comparative et de phylogénie ont mis en évidence que les souches pathogènes et commensales d'*E. coli* appartiennent à des lignées phylogénétiques ayant évolué de façon divergente.

Pour étudier les relations phylogénétiques entre individus, les gènes de ménage sont préférentiellement utilisés car ils sont peu soumis à des pressions de sélection. Les plus classiquement utilisés sont le gène *rrs* qui code l'ADNr 16S, le gène *recA*, codant une protéine de réparation et de recombinaison de l'ADN et le gène *gyrB*, qui code la sous unité B de l'ADN gyrase. L'ADNr 16S est ubiquiste chez les bactéries et extrêmement conservé. Il est donc performant pour étudier les relations phylogénétiques entre genres bactériens. Par exemple, sur la base de l'ADNr 16S, la famille des *Enterobacteriaceae* forme un groupe monophylétique (Dauga, 2002). Par contre, il n'est pas assez discriminant à un niveau intragenre pour différencier les espèces du genre *Escherichia* ou les différentes souches de l'espèce *E. coli* (Cilia *et al.*, 1996). De même, le gène *recA* ne permet pas de distinguer les souches de *Shigella* spp. et les souches d'*E. coli* (Lloyd & Sharp, 1993). Le gène *gyrB*, quant à lui, présente un taux de mutations 3 fois plus élevé que l'ADNr 16S. Ce gène polymorphe est donc plus efficace pour établir les relations phylogénétiques entre espèces proches. Il permet ainsi de discriminer les souches de *Shigella* spp. par rapport à celles d'*E. coli* ainsi que les souches d'*E. coli* entre elles (Fukushima *et al.*, 2002). Cependant, un seul gène n'est pas représentatif du génome d'une bactérie. Il convient mieux d'utiliser des approches multilocus. Elles permettent en effet de recouvrir une plus grande partie du génome et donc d'analyser



robustement des relations phylogénétiques, notamment entre bactéries entériques (Wertz *et al.*, 2003 ; Nelson & Selander, 1992).

Par électrophorèse enzymatique multilocus (MLEE pour *MultiLocus Enzyme Electrophoresis*) sur 38 enzymes métaboliques, 4 groupes phylogénétiques majeurs ont été définis chez *E. coli*, les groupes A, B1, B2, D, ainsi qu'un groupe mineur, le groupe E (Pupo *et al.* 1997 ; Herzer, 1990). Cette structuration des populations d'*E. coli* est en relation directe avec l'adaptation des souches à leur hôte (Duriez *et al.*, 2001 ; Souza *et al.*, 1999). Il est possible de distinguer les souches appartenant à chacun de ces groupes par la taille de leurs génomes et par la présence ou l'absence de certains gènes, en particulier ceux codant des facteurs de virulence. Les groupes B2 et D, phylogénétiquement proches, contiennent de nombreuses souches virulentes. La taille moyenne de leur génome est respectivement de 5100 kb et 5300 kb. Le gène *chuA*, codant une protéine de transport chez *E. coli* O157:H7, est présent sur leur génome. La distinction entre le groupe B2, contenant les souches les plus virulentes, et le groupe D peut se faire sur la base de la présence (B2) ou l'absence (D) du gène *yjaA*. La fonction de ce gène est néanmoins encore inconnue (Clermont *et al.*, 2000). Les groupes A et B1 contiennent surtout des souches commensales avec des génomes plus restreints *i.e.* respectivement de 4800 kb et 5000 kb en moyenne. Ces souches ne possèdent pas le gène *chuA* et portent peu de facteurs de virulence. Les groupes A et B1 peuvent se distinguer par la présence (B1) ou l'absence (A) d'un fragment d'ADN nommé TSPE4 C2 dont la fonction est également inconnue (Clermont *et al.*, 2000). Un débat a émergé pour déterminer le groupe phylogénétique à partir duquel les groupes actuels ont émergé. D'après plusieurs auteurs (Escobar-Páramo *et al.*, 2004 ; Lecointre *et al.*, 1998 ; Herzer, 1990), le groupe B2 présenterait l'origine la plus ancienne. Or, Wirth *et al.* (2006) ont montré que selon l'algorithme utilisé pour établir les arbres phylogénétiques, le groupe le plus ancien peut aussi bien être B2 que D et que les relations entre les groupes phylogénétiques divergent également.

La structuration de l'espèce *E. coli* en 5 groupes phylogénétiques a été confirmée par d'autres approches multilocus. Ainsi, l'étude du polymorphisme d'un nucléotide simple (SNP, pour *Single Nucleotide Polymorphism*) sur 5 gènes de ménage (*trpA*, *trpB*, *putB*, *icdA* et *polB*), permet d'étudier les relations entre différentes souches d'*E. coli* d'une façon rapide, peu coûteuse, reproductible et facile à mettre en oeuvre (Hommais *et al.*, 2005). Lorsqu'ils sont considérés séparément, certains de ces gènes montrent de l'incongruence ponctuelle vis-à-vis des relations entre les 5 groupes phylogénétiques de l'espèce *E. coli*. Cependant, cette incongruence disparaît en considérant les 5 gènes ensemble (Lecointre *et al.*, 1998).

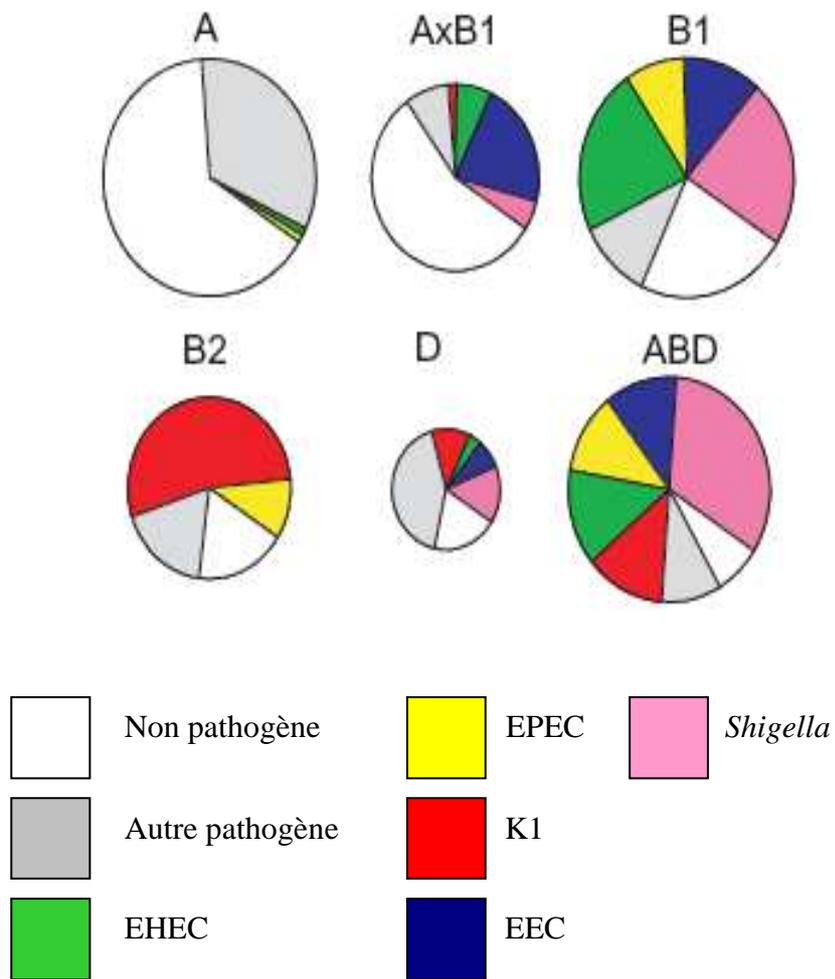


Figure 13 : Répartition des différentes souches d' *E. coli* selon leur mode de pathogénie dans les différents groupes phylogénétiques majeurs. D'après Wirth *et al.* (2006)

Si la notion de clonalité des populations d'*E. coli* est admise par différents auteurs (Milkman, 1997 ; Desjardins *et al.*, 1995 ; Selander *et al.*, 1986), elle a été récemment remise en cause par Wirth *et al.* (2006). Des groupes hybrides (AxB1 et ABD) sont en effet apparus suite à l'analyse des relations phylogénétiques entre 460 isolats d'*E. coli* de différentes origines géographiques et de différents hôtes. Ces groupes hybrides présentent des taux de recombinaison plus forts que les autres groupes et sont principalement composés de souches pathogènes très virulentes. Il y aurait donc un lien direct entre virulence et taux de recombinaison élevé (Wirth *et al.*, 2006). Plus de la moitié des souches de *Shigella* spp. appartiennent à ces groupes hybrides ; les autres souches appartenant aux groupes B1 ou D. L'appartenance des espèces du genre *Shigella* à l'espèce *E. coli* fait également débat. En effet, *E. coli* et les espèces du genre *Shigella* (*S. boydii*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae*) présentent entre 70 et 100 % d'homologie ADN-ADN. Tous ces taxons devraient donc être considérés comme une seule et unique espèce, *E. coli* (Brenner, 1984). Toutefois, aucune proposition formelle n'a été publiée et le genre *Shigella* conserve donc un statut dans la nomenclature bactérienne ([www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)). Les différentes espèces de *Shigella* se distinguent les unes des autres sur la base du gène *rrs* (Rolland *et al.*, 1998). La Figure 13 représente la distribution des souches d'*E. coli* (et donc des *Shigella* spp.) selon leur mode de pathogénie dans les différents groupes phylogénétiques. Néanmoins, à un groupe donné ne correspond pas un mode particulier de pathogénie. Par contre, les *Shigella* et les EHEC sont absents des groupes A et B2 (Wirth *et al.*, 2006). D'après ces derniers auteurs, l'analyse d'un nombre supérieur d'isolats naturels mènerait avec de grandes probabilités à l'apparition de groupes supplémentaires par rapport aux 7 cités précédemment (*i.e.* A, B1, B2, D, E, AxB1, ABD).

L'histoire évolutive d'*E. coli* conduit à l'émergence de nouveaux clones. Dans l'environnement, il est tout à fait possible que certains de ces clones évoluent vers des lignées particulières, commensales ou pathogènes, présentant des capacités d'adaptation spécifiques. Ainsi, dans le sol, certaines populations d'*E. coli* pourraient présenter un état physiologique proche de celui des bactéries indigènes. Elles auraient donc la capacité de survivre à long terme dans cet environnement.

Tableau 8 : Exemples d'études de la diversité de populations d'*E. coli* naturelles selon différentes approches moléculaires développées à partir d'isolats

Milieus/Hôtes	Techniques utilisées	Références bibliographiques
Animaux	MLEE, BOX-PCR, rep-PCR, ERIC-PCR, PFGE, RAPD, RFLP, profil d'antibiorésistance	Souza <i>et al.</i> (1999), Yang <i>et al.</i> (2004), McLellan <i>et al.</i> (2003), Aslam <i>et al.</i> (2003, 2004), Jarvis <i>et al.</i> (2000), Anderson <i>et al.</i> (2005)
Hommes	Triplex PCR, MLSA, MLEE, profil d'antibiorésistance	Duriez <i>et al.</i> (2001), Gordon <i>et al.</i> (2002), Anderson <i>et al.</i> (2005)
Fosses sceptiques	MLEE	Gordon <i>et al.</i> (2002)

#### IV.2. Diversité naturelle des populations d'*E. coli* dans l'environnement

Dans l'environnement, l'ensemble des clones d'*E. coli*, commensaux ou pathogènes, sont soumis aux différents facteurs de stress évoqués dans le chapitre II. Ces stress peuvent entraîner une sélection de certaines populations, plus ou moins capables d'y résister. Ainsi, certains environnements pourraient être le siège de sélection de populations particulières d'*E. coli*. La diversité des populations d'*E. coli* peut être étudiée par différentes approches, moléculaires ou non, notamment en utilisant l'étude du polymorphisme du gène *uidA*. A l'heure actuelle, la majorité des approches concernant la diversité des populations d'*E. coli* sont basées sur l'isolement d'individus. Ce type d'approche comporte deux biais importants. Tout d'abord, les approches par isolats ne permettent d'accéder qu'à la diversité des populations cultivables et pas à celle des populations non-cultivables. Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre III2., *E. coli* peut être présente sous la forme VBNC dans l'environnement. La quasi-totalité des études de diversité concernant cette bactérie est néanmoins réalisée suite à des enrichissements. Les VBNC sont donc rarement prises en compte. Ensuite, les approches par isolats permettent d'analyser uniquement les populations majoritaires et pas les populations minoritaires. Pourtant, malgré les défauts des approches par isolats, les approches populationnelles sont rares.

La diversité des populations naturelles d'*E. coli* a été étudiée dans différents environnements par différentes techniques. Des exemples d'études de diversité de souches d'*E. coli* isolées de l'homme et d'animaux sont présentées Tableau 9. D'une façon générale, l'ensemble de ces études a montré l'existence d'une grande variété de souches d'*E. coli*, commensales ou pathogènes, dans les matières fécales. Cette variabilité est observable chez les hôtes animaux aussi bien à un niveau inter qu'infraspécifique. Un changement de régime alimentaire des animaux conduit également à une modification de la composition des populations d'*E. coli*. La structure des populations d'*E. coli* évolue fortement lors du vieillissement des matières fécales.

La diversité des populations naturelles d'*E. coli* a également été étudiée à partir d'échantillons environnementaux. L'équipe de M.J. Sadowsky a utilisé à plusieurs reprises une méthode d'amplification de séquences palindromiques de type HFERP (pour *horizontal fluorophore-enhanced repetitive extragenic palindromic-PCR*) pour étudier la diversité des populations naturelles d'*E. coli* dans des fèces d'animaux et dans des sols tempérés de bassins versants du Minnesota (Byappanahalli *et al.*, 2006 ; Ishii *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2004). Ces travaux ont également montré que les souches d'*E. coli* isolées de différents animaux présentaient une importante diversité. Certaines populations d'*E. coli* ont également été

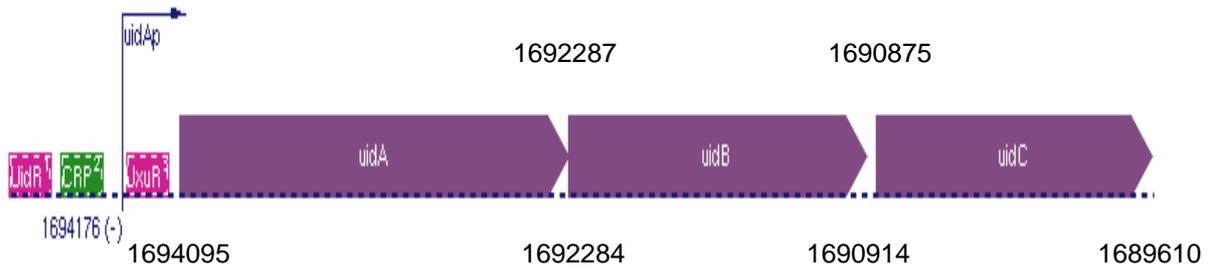


Figure 14 : Structure de l'opéron *uidABC*. Le gène *uidA* est situé entre la position 1694095 et la position 1692284 sur le chromosome d'*E. coli* K12

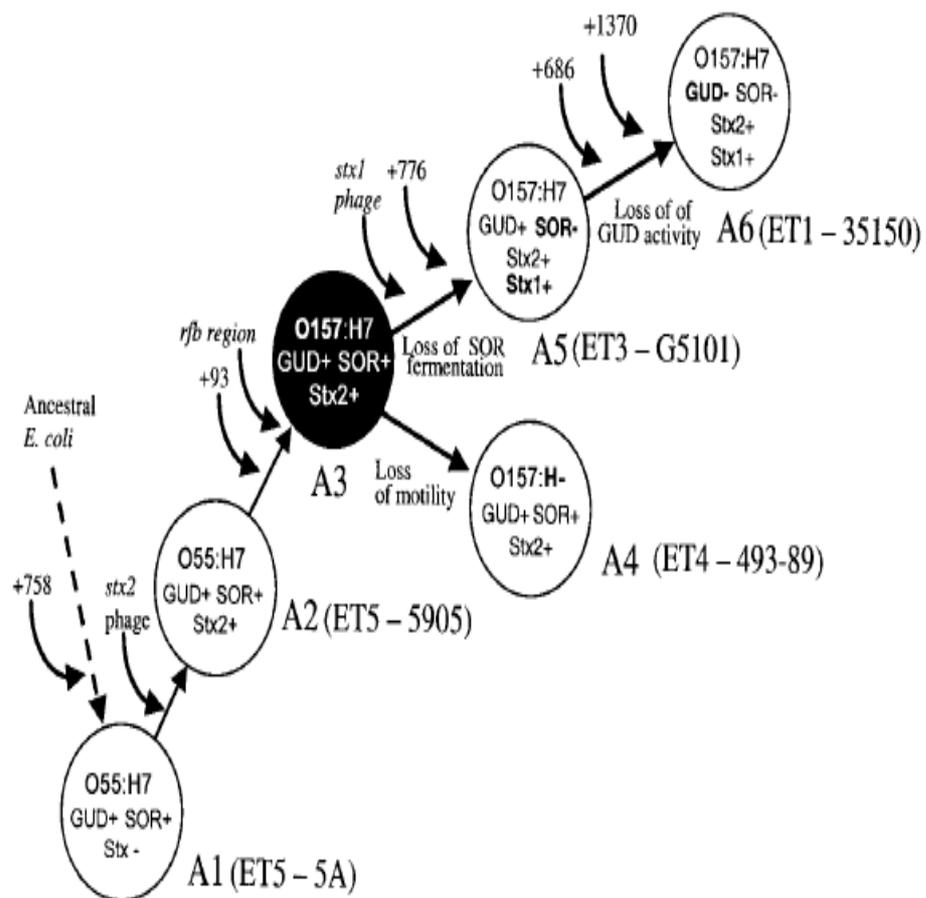


Figure 15 : Évènements de mutations sur le gène *uidA* qui sont apparus au cours de l'histoire évolutive du sérotype *E. coli* O157:H7. D'après Monday *et al.* (2001)

suspectées comme s'étant naturalisées au sol. L'électrophorèse en gel de gradient dénaturant (ou PCR-DGGE pour *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) est une méthode de typage moléculaire qui est également fréquemment utilisée pour étudier la structure des populations d'*E. coli* (Sigler & Pasutti, 2006 ; Lasalde *et al.*, 2005 ; Buchan *et al.*, 2001 ; Farnleitner *et al.*, 2000). Cette méthode permet la séparation par électrophorèse de fragments d'ADN de même taille sur la base du polymorphisme de leurs séquences. Pour les séparer, un gradient croissant de conditions dénaturantes est appliqué (formamide et urée). Cette méthode a par exemple été mise en oeuvre pour identifier l'origine animale des contaminants fécaux trouvés dans l'eau, qu'ils soient ou non pathogènes ; on parle de *Bacterial Source Tracking* (ou BST) (Somarelli *et al.*, 2007 ; Meays, 2006 ; Meays *et al.*, 2004 ; Hartel *et al.*, 2003 ; Gordon *et al.*, 2002). Buchan *et al.* (2001) ont utilisé la PCR-DGGE ciblant l'intergène 16S-23S pour comparer la structure des populations d'*E. coli* chez différents animaux et dans le cours d'eau localisé à proximité. Une grande variabilité des populations d'*E. coli* a été observée entre animaux. Cependant, cette forte variabilité ne permettait pas d'identifier facilement l'origine animale des différentes souches d'*E. coli* présentes dans l'eau. Le BST peut également s'effectuer en étudiant les profils d'antibiorésistance des isolats bactériens. Ainsi, Parveen *et al.* (1997) ont analysé la diversité de profils d'antibiotirésistance de 765 souches d'*E. coli* isolées de fèces humains et animaux et d'eaux de surface dans un estuaire de Floride (pollution diffuse) et d'une station d'épuration (STEP) (pollution non diffuse). Une plus grande proportion d'isolats résistants à au moins un antibiotique et une plus grande diversité des profils d'antibiorésistance ont été observées chez les souches d'*E. coli* isolées dans les STEP municipales. Ceci suggère l'occurrence de certaines populations d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques dans les environnements fortement anthropisés.

D'autres études sont basées sur le polymorphisme du gène *uidA*, codant la  $\beta$ -D-glucuronidase (voir chapitre I.2.). Nous avons choisi d'étudier plus en détails ces travaux dans cette synthèse du fait du rôle central de cette enzyme, notamment pour la détection d'*E. coli* dans l'eau (norme AFNOR NF T 90-433). L'étude du polymorphisme du gène *uidA* est également intéressante puisqu'au cours de l'évolution, des mutations conduisant à une  $\beta$ -D-glucuronidase non fonctionnelle sont apparues, notamment lors de l'émergence du sérotype pathogène *E. coli* O157:H7.

Tableau 9 : Comparaison de codons du gène *uidA* différents chez les souches *E. coli* K12 et *E. coli* O157:H- 493-89 possédant l'activité  $\beta$ -D-Glucuronidase et chez la souche *E. coli* O157:H7 ATCC 35150,  $\beta$ -D-Glucuronidase négative. D'après Monday *et al.* (2001)

Base-change position <sup>a</sup>	K12 <sup>b</sup>	493-89 <sup>c</sup>	ATCC 35150 <sup>c</sup>
-23	A	T	T
+93	GAT	GAG (D31E)	GAG (D31E)
+191	GCG	GTG (A64V)	GTG (A64V)
+393	ACC	ACA	ACA
+501	TAT	TAC	TAC
+686 <sup>d</sup>	—	—	GG (frameshift)
+690	ACT	ACC	ACC
+758	TGC	TAC (C253Y)	TAC (C253Y)
+776 <sup>d</sup>	CAG	CAG	CGG (Q259R)
+801	CTT	CTG	CTG
+849	ATT	ATC	ATC
+882	GGT	GGC	GGC
+900	GAC	GAT	GAT
+906	CGT	CGC	CGC
+942	GAC	GAT	GAT
+1059	GCT	GCA	GCA
+1158	CAA	CAG	CAG
+1308	GAC	GAT	GAT
+1370 <sup>d</sup>	AGC	AGC	ATC (S457I)
+1410	GGA	GGT	GGT
+1671	TCG	TCG	TCA
+1704	AAA	AAG	AAG
+1716	ACT	ACC	ACC

<sup>a</sup> With respect to *gusA* open-reading frame ATG start codon. Sites in bold represent regions where substitution resulted in alteration of the promoter sites or incorporation of alternative amino acids into the primary structure of the protein. Resulting amino acid substitutions are shown in parentheses.

<sup>b</sup> GenBank accession no. D90805 submitted by the Japan *E. coli* Genome DNA Sequencing Project group.

<sup>c</sup> Determined in this study.

<sup>d</sup> Nucleotide substitution that is unique to the ATCC 35150 strain.

### IV.3. Analyse de la diversité des populations naturelles d'*E. coli* basée sur l'utilisation du polymorphisme du gène *uidA*

#### IV.3.1. Le gène *uidA*

Le gène *uidA* code la  $\beta$ -D-glucuronidase, une enzyme catalysant l'hydrolyse des  $\beta$ -D-glucuronides (Novel et Novel, 1973). Ce gène, d'une longueur de 1812 pb, fait partie d'une structure opéronique (*uidABC*) (Figure 14, source : <http://biocyc.org>). Une seule copie de *uidA* et de l'opéron (*uidABC*) est présente sur le chromosome d'*E. coli* (Sigler & Pasutti, 2006) localisée à 36,5 min sur le génome d'*E. coli* (Blattern *et al.*, 1997). Toutes les souches d'*E. coli* connues portent le gène *uidA* (Feng *et al.*, 1991). Ainsi, la détection par PCR de ce gène est utilisée comme outil de diagnostic de contamination fécale des eaux et de coquillages (Bower *et al.*, 2005 ; Brasher *et al.*, 1998 ; Juck *et al.*, 1996 ; Bej *et al.*, 1991 ; Green *et al.*, 1991). Les propriétés génétiques de ce gène permettent également la détection de souches pathogènes par PCR ou par puces à ADN (Bottero *et al.*, 2004; Takiya *et al.*, 2004 ; Bekal *et al.*, 2003 ; Cebula *et al.*, 1995 ). En effet, comme cité précédemment, des souches d'*E. coli* portent le gène *uidA* mais ne possèdent pas l'activité correspondante. Il s'agit de souches entérohémorragiques appartenant au sérotype O157:H7 (McDaniels *et al.* 1996 ; Doyle & Schoeni, 1984). Vingt-trois positions sont divergentes entre les séquences *uidA* d'*E. coli* K12 et d'*E. coli* O157:H7 (Tableau 9). La non-fonctionnalité de la protéine est due à l'insertion d'une guanine en position 686 qui décale le cadre ouvert de lecture et fait apparaître un codon-stop (Takiya *et al.*, 2004 ; Monday *et al.*, 2001) (Figure 15).

En dehors d'*E. coli* et de *Shigella* spp., très peu d'informations sur l'existence du gène *uidA* chez d'autres espèces bactériennes sont disponibles.

#### IV.3.2. Etudes de la diversité des populations d'*E. coli*

La plupart des études basées sur l'utilisation du polymorphisme de ce gène pour étudier la diversité des populations d'*E. coli* ont été réalisées par PCR-DGGE à partir d'échantillons issus d'environnements secondaires, à savoir dans l'eau et des sédiments ainsi que dans des sols tropicaux naturels (Sigler & Pasutti, 2006 ; Lasalde *et al.*, 2005 ; Farnleitner *et al.*, 2000). Le polymorphisme du gène *uidA* a été étudié après l'amplification d'une séquence partielle de 166 pb avec les amorces UAL-1939 et UAR-2105, dessinées par Bej *et al.* (1991) et qui ciblent une région présentant 9 sites polymorphiques. Ces mêmes amorces ont été utilisées pour comparer la structure des populations d'*E. coli* dans les différents



compartiments d'un bassin versant alpin pâturés dans ce travail de thèse (Chapitre 4). La PCR-DGGE *uidA* a ainsi été utilisée dans 3 études via des approches par isolats et populationnelles. Dans des eaux douces, 10 allèles différents ont été détectés sur 47 isolats d'*E. coli* (Farnleitner *et al.*, 2000). Dans un sol tropical naturel, 9 amplicons différents ont été obtenus sur 205 isolats d'*E. coli* (Lasalde *et al.*, 2005). Les approches par isolats et populationnelles ont été comparées pour étudier la structure de populations d'*E. coli* dans 2 eaux différentes et dans les sédiments associés à ces eaux (Sigler & Pasutti, 2006). Sur 175 isolats, 15 phylotypes associés à plusieurs environnements ou à un seul ont été révélés ainsi que 50 phylotypes uniques, c'est-à-dire n'apparaissant qu'une seule fois. L'approche populationnelle, réalisée après enrichissement, a permis de mettre en évidence entre 16 et 31 bandes différentes selon l'environnement. Sur ces profils mixtes, l'analyse par regroupement (i.e. *clustering*) a par ailleurs révélé que des échantillons issus de matrices différentes mais connectées entre elles (eau et sédiments associés) se montraient plus proches que des échantillons issus de matrices identiques mais déconnectées entre elles (eaux à 2 localisations différentes), suggérant des transferts de populations d'un compartiment à un autre.

L'ensemble de ces études a révélé l'existence d'une importante diversité des souches d'*E. coli* dans l'environnement. De plus, ces travaux ont mis en évidence la nécessité d'utiliser des approches populationnelles plutôt que des approches par isolats en vue de l'identification de l'origine environnementale ou animale des contaminations fécales dans l'eau. Enfin, la PCR-DGGE ciblant le gène *uidA* s'est révélé être un outil adéquat pour ce type d'étude.



## **Hypothèses de travail et démarche expérimentale**



La synthèse bibliographique a mis en évidence l'existence d'une diversité d'*E. coli* avec des souches commensales ou pathogènes. Le milieu primaire d'*E. coli* est le système digestif des hommes et des animaux à sang chaud. Néanmoins, cette espèce bactérienne présente des traits de vie très ubiquistes avec une grande capacité à coloniser une variété d'environnements, en particulier ceux présents dans les différents niveaux d'organisation des systèmes terrestres et aquatiques. Pour se maintenir dans ces environnements secondaires, *E. coli* met en place des stratégies adaptatives, notamment grâce à la régulation fine de l'expression de certains gènes, afin de répondre aux contraintes liées au contexte physique et biologique dans lequel cette bactérie est introduite. Toutes les souches d'*E. coli* ne sont néanmoins pas capables de coloniser l'environnement avec la même efficacité.

Nos hypothèses de travail sont de supposer que :

- Dans l'environnement particulier des écosystèmes pâturés, il y a sélection de certaines souches capables de s'adapter à des conditions changeantes de celles de leur milieu primaire. S'il existe une variété de souches d'*E. coli* dans l'environnement, toutes les techniques d'étude de la diversité ne permettent pas de l'observer directement dans la mesure où il s'agit de cibler un (ou des) fragment(s) d'ADN présentant un niveau de polymorphisme suffisant pour détecter de la diversité mais également des homologies entre certaines souches. Il faut donc trouver la méthode la plus performante et la plus adaptée à l'environnement considéré. Nous avons sélectionné la technique de DGGE puisque celle-ci permet, en théorie, de détecter des différences entre deux séquences d'ADN à une base près. Elle nous a donc semblé appropriée pour l'étude des populations à l'échelle d'une espèce bactérienne.

- Ce sont l'ensemble des facteurs d'ordre agronomique (pression d'entrée de bouses), pédologique (par exemple, degré d'acidification) et climatique (contrastes saisonniers et notamment la fonte des neiges pendant laquelle le ruissellement est intense) qui sont impliqués dans le contrôle des populations d'*E. coli*. Il est donc nécessaire de bien caractériser le fonctionnement de l'alpage étudié et d'en tenir compte lors de l'établissement des dispositifs expérimentaux, avec des protocoles croisant les différentes interactions potentielles des facteurs.

- Les évolutions adaptatives se traduisent par des états physiologiques particuliers des populations bactériennes fécales dans l'environnement. Pour dépasser le cadre des études de



viabilité ou d'activité, il y a nécessité de mettre au point des outils moléculaires pour révéler ces évolutions.

La démarche expérimentale mise en œuvre se rattache à ces 4 axes de travail :

- En premier lieu, nous cherchons à évaluer la dispersion d'*E. coli* depuis les bouses et son introduction dans le sol, avec une analyse des conditions de sa survie dans différents compartiments du bassin versant étudié (dans les bouses, les sols des stations pastorales et l'eau à l'exutoire du bassin versant). Le sol rhizosphérique est en particulier étudié comme réservoir environnemental en *E. coli*, susceptible de l'héberger et d'alimenter le cours d'eau de l'alpage. Un référentiel bactérien nous semble nécessaire pour conduire cette approche. Nous choisissons d'étudier, en parallèle des dynamiques d'*E. coli*, le comportement de populations bactériennes indigènes et adaptées au sol, les *Pseudomonas* spp. fluorescents. A cette fin, la démarche prévoit de suivre les effectifs d'*E. coli* et de *Pseudomonas* spp. fluorescents aux différentes échelles spatiales et temporelles qui structurent le fonctionnement de l'écosystème pastoral.

- Par ailleurs, pour évaluer dans quelle mesure *E. coli* est susceptible de mettre en place des stratégies adaptatives pour se maintenir voire s'installer dans des réservoirs environnementaux, on tentera la mise au point de marqueurs moléculaires de l'état physiologique d'*E. coli*, relatifs à sa division et à sa dormance. Toutes les souches d'*E. coli*, n'ayant, *a priori*, pas le même potentiel de survie dans l'environnement, le poids de l'environnement d'origine d'*E. coli* est également testé par des approches expérimentées en conditions contrôlées.

-La structure génétique des populations d'*E. coli* est étudiée dans les différents niveaux d'organisation du bassin versant de façon à déterminer si des génotypes sont préférentiellement sélectionnés en relation avec la nature des sols, des horizons et de la durée d'exposition des sols aux déjections animales.

- Il s'agit enfin d'évaluer si la structure génétique des populations d'*E. coli* est susceptible de révéler les zones potentiellement contributives à la contamination fécale de l'eau à l'exutoire du bassin versant.



facteurs impliqués dans la régulation de la transcription génique au cours de la croissance bactérienne (par exemple, pour *rpoS*, Venturi, 2003).

Les essais réalisés sur l'expression des marqueurs d'état physiologique montrent qu'une calibration de la méthode est encore nécessaire, notamment pour les marqueurs *rpoZ*, *dps* et *rmf* qui présentent, dans certains microcosmes, des réponses cohérentes (expression soit du marqueur de division soit du marqueur de phase stationnaire). Une suggestion serait de réaliser une rétrotranscription spécifique de chaque gène et non aléatoire comme cela a été fait au cours de ce travail. Une rétrotranscription aléatoire conduit à la synthèse d'ADNc à partir de l'ensemble des ARNs présents dans l'échantillon. De ce fait, les ARNs d'*E. coli*, minoritaires (du fait des faibles niveaux de populations), se retrouvent dilués au sein des ARNs de la communauté microbienne totale du sol ce qui rend difficile l'accès à la cible. Une RT-PCR spécifique permettrait d'amplifier spécifiquement le gène marqueur recherché, stratégie plus efficace mais écartée dans un 1<sup>er</sup> temps de part sa lourdeur lorsque plusieurs gènes doivent être considérés en parallèle.

Par ailleurs, les niveaux de transcrits des marqueurs chez les *Pseudomonas* spp. doivent être étudiés. Une fois le protocole mis au point et validé pour l'ensemble des populations étudiées (notamment, après avoir vérifié par séquençage l'identité des amplifiats obtenus à partir du sol), des rapports d'expression entre les différents marqueurs devraient être analysés afin d'établir si les populations bactériennes indigènes et introduites sont plutôt en état de division ou en état de dormance. La comparaison des rapports d'expression des marqueurs chez *E. coli* et chez *Pseudomonas* spp. devrait également permettre de savoir si ces deux populations présentent ou non le même état physiologique.



**Chapitre 1 :**  
**L'alpage de Bise**



## L'alpage de Bise

### **I. Une unité pastorale remarquable**

Un alpage est une " unité pastorale d'altitude ", c'est-à-dire un ensemble de prairies permanentes et semi naturelles utilisées par un troupeau durant l'été. Les alpages sont généralement situés à l'étage subalpin et en tête de bassin versant, là où se constitue une part importante des ressources en eau. Les alpages sont le symbole du pastoralisme et de son emprise sur le milieu alpin. Ils ont été créés aux XII<sup>ème</sup> et XIII<sup>ème</sup> siècles suite aux déboisements des forêts alpines notamment par les moines.

Traditionnellement, l'exploitation agricole des Alpes est étagée selon l'altitude pour profiter au maximum de l'étalement de la pousse de l'herbe qui résulte du gradient thermique altitudinal. Cette mise en valeur des herbages d'altitude a été considérée d'emblée comme une caractéristique clef de l'exploitation du milieu alpin. De nos jours, l'usage de ces territoires d'altitude participe à la renommée et à l'image de terroir et d'authenticité des produits fromagers des Alpes (Dorioz *et al.*, 1999). Par ailleurs, la vocation traditionnelle des alpages s'est élargie du fait d'usages liés au tourisme, à la conservation de la nature, à la biodiversité... Les alpages constituent désormais un patrimoine naturel, culturel et paysager (Dubost & Bornard, 1989).

Les modalités d'utilisation des alpages variaient et varient encore fortement d'une région alpine à l'autre. Dans le Beaufortain par exemple, les vaches passaient les nuits attachées à un piquet ou sur un petit replat creusé à la main dans la pente (le « pachon »). 50 % des déjections étant émises la nuit, cette pratique constituait une manière efficace de « fertiliser » les terrains les plus difficiles ou les plus sensibles à l'enfrichement. Dans les régions d'alpages du Chablais ou celles dominées par des sols calcaïques, ce souci du maintien de la fertilité est moins présent, voire absent de longue date (Dorioz & Party, 1987). Depuis vingt ans, en relation avec la diminution de la main d'œuvre disponible, les pratiques d'exploitation des alpages ont largement évolué, notamment en matière de conduite des animaux et d'entretien des surfaces ; les formules de parcage sont apparues moins contraignantes en terme de contrainte de travail, mais moins efficaces en terme de maintien des potentialités agricoles. Ces changements, qui semblent se traduire par des évolutions du couvert végétal, suscitent des interrogations sur l'aptitude de ces territoires à remplir à la fois les fonctions agronomiques et environnementales que leur attribue ce statut de haut lieu de la



production agricole et du patrimoine .

## **II. Un alpage, un agro-écosystème (d'après Dorioz, 1998)**

L'alpage comprend un territoire (de surface en général supérieure à 50 ou 100 ha) déterminé par le relief, les ressources herbagères, un ou des troupeaux et les bergers avec leurs logiques et leurs habitudes. L'ensemble territoire-troupeau-végétation-bergers constitue un système caractérisé par des interactions, des entrées et des sorties avec plusieurs niveaux d'organisation emboîtés.

A l'échelle de l'alpage entier, les grandes lignes du circuit de pâturage se décident en fonction des objectifs des bergers et des contraintes liées à la topographie ou liées aux animaux. La stratégie globale consiste à profiter au mieux des éventuels contrastes topoclimatiques pour bénéficier le plus longtemps possible d'herbages de qualité suffisante. En conséquence, le relief et les dénivelés sont des facteurs qui structurent fortement l'organisation et le fonctionnement de l'alpage.

L'alpage est divisé en " quartiers ", sous-unités analogues à la parcelle en zone de fauche. En l'absence de parc, les bergers fixent les limites de ces quartiers (de 10 à 100 ha) en fonction de la présence d'eau, des connaissances empiriques sur l'herbe (précocité, qualité...), de la topographie (distances, pentes et obstacles tels que crêtes ou talwegs) et des aménagements (eau, chemin). Évidemment, la charge (nombre d'animaux par hectare) et le mode de fréquentation dépendent de la situation relative du quartier. Au sein de chaque quartier, il est possible de distinguer un niveau inférieur : le niveau "station pastorale".

La station pastorale (0,1 à 0,01 ha) et ses caractéristiques fourragères et pédologiques ne se comprennent bien que si l'on considère, d'une part, les niveaux qui l'englobent, c'est-à-dire le quartier et l'alpage, et, d'autre part, les relations sols/végétations et enfin le comportement éco-physiologique des espèces végétales structurantes (par exemple, les espèces refusées en permanence par les animaux). Certains phénomènes s'expriment plus spécifiquement à l'échelle de la station. C'est le cas du comportement animal face à l'herbe disponible et réciproquement de l'adaptation des végétaux à la pression pastorale. Les végétations ont plus ou moins d'appétence pour les troupeaux. Ces derniers modifient la végétation par le biais de plusieurs actions " élémentaires " : (i) le piétinement déchausse la végétation, tasse le sol, et certains cas, est responsable de la mise à nu des sols ; (ii) la coupe, dont le mode varie selon le type d'animal, diminue la surface photosynthétique, modifie le microclimat lumineux au



niveau des bourgeons et induit des réactions de la plante et (iii) le prélèvement exporte des éléments nutritifs et les déjections à l'inverse, permettent le retour au sol de sels et de matières organiques transformées par la digestion, c'est-à-dire à bas rapport C/N.

A l'échelle des quartiers et de l'alpage, le pâturage peut se traduire par l'établissement de zones déficitaires en éléments nutritifs et à l'inverse, de secteurs surenrichis en déjections animales et déchets nutritifs. Dans les secteurs déficitaires, il existe un appauvrissement relatif du sol en phosphore. Le taux de restitution varie globalement selon les éléments (le potassium est mieux restitué que l'azote, lui-même mieux restitué que le phosphore) et localement, selon la durée de la fréquentation et l'époque de pâture. Une partie importante des déjections se produit lors des trajets et la nuit, à l'étable ou dans le parc. Il s'en suit que, sauf situations particulières ou pratiques correctives d'épandage, la tendance générale est au déficit des restitutions par rapport aux prélèvements.

Le sol peut compenser les pertes si elles ne sont pas trop élevées et, si la fourniture par altération est importante. Cette dernière condition est souvent réalisée dans les sols calciques pour des éléments tels que le potassium, le calcium et le magnésium. En ce qui concerne l'azote, un fort prélèvement de végétation par le troupeau tend à favoriser les légumineuses, fixatrices d'azote grâce à leur association avec des bactéries symbiotiques.

Selon la position de la station dans le quartier et du quartier dans l'alpage, l'herbe sera pâturée à des stades phénologiques différents et donc dans des états différents. En bref, l'appétence chute brutalement et globalement (pour 80 % des espèces) environ à la floraison. Ainsi, toute station fréquentée par les animaux au-delà de ce stade tendra à être sous-exploitée.

Les excès de restitution ont surtout lieu à proximité des bergeries et des points de traite, le long des chemins, dans les quartiers faisant l'objet d'une fertilisation organique. L'équilibre relatif s'observe sur sols calciques, dans des secteurs un peu périphériques et de ce fait, sous-pâturés. Les déficits sont typiques des parcelles situées à mi-distance entre les précédentes. Au total, les effets liés à la circulation des troupeaux provoquent une différenciation de la végétation qui reflète les gradients de pâture, de distance à la bergerie et de pente. Cependant, les séquences sur la végétation varient selon le contexte géomorphologique et pédologique (Dorioz & Party, 1987 ; Dorioz, 1987).

Ces différents niveaux d'organisation font des alpages le support d'un ensemble d'écosystèmes différents, présentant des couverts végétaux et des rhizosphères associées typiques du milieu montagnard, des sols aux caractéristiques physicochimiques particulières,

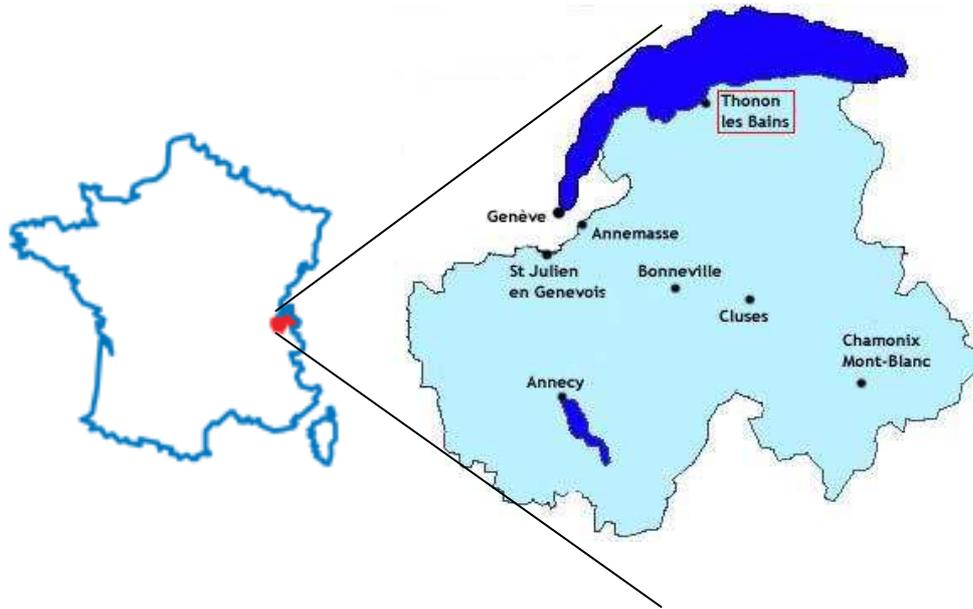


Figure 16 : Département de la Haute Savoie en France

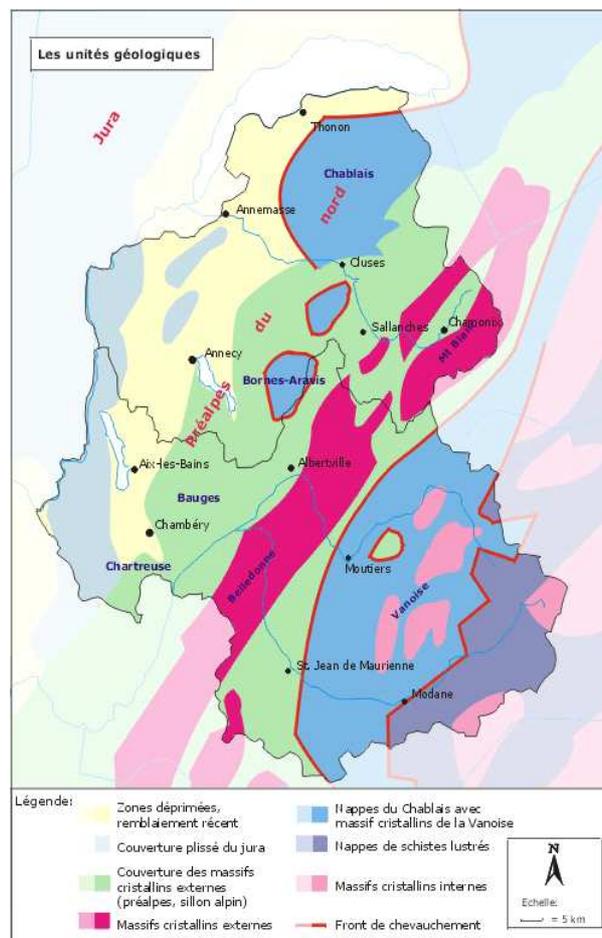


Figure 17 : Carte géologique des Alpes du Nord et position particulière du Chablais

ainsi qu'une faune singulière en relation directe avec la bouse (insectes, coprophages, vers). Chacun de ces écosystèmes est susceptible de régir, de façon spécifique, les comportements des populations microbiennes, introduites ou résidentes.

### **III. Le bassin versant de l'alpage de Bise**

#### **III.1. Généralités**

Un bassin versant hydrologique est défini comme étant l'ensemble des surfaces qui contribue à alimenter l'écoulement d'un cours d'eau. Sa délimitation se base essentiellement sur la topographie. L'approche bassin versant consiste à enregistrer des signaux à l'exutoire résultant d'une intégration spatiale des processus, de les comparer avec des signaux d'entrées (pluies, épandages..) et à les traduire en bilans ou en typologie de fonctionnement reliant état du bassin et entrée/exportation d'eau et d'éléments (Dorioz *et al.*, 1998).

L'alpage de Bise se localise en Haute-Savoie, dans le Massif du Chablais des pré-Alpes calcaires. Plus précisément, l'alpage est situé dans un vallon entre la Pointe de Bénévent et les Cornettes de Bise (Figures 16, 17, 18 et 19). Situé dans une vallée en amont du village de Vacheresse, ce lieu est prisé par les randonneurs. Cette zone est parcourue par les troupeaux et entretenue par l'activité humaine depuis plusieurs siècles (évaluation 600 ans au moins). L'alpage est situé à l'étage subalpin au dessus de 1500 mètres et aucune habitation n'est implantée en amont de l'exutoire du bassin versant. Cela permet de limiter les perturbations autres que celles du pastoralisme, notamment les rejets d'eaux usées domestiques ou autres. Le site est recouvert d'un épais manteau neigeux, pouvant atteindre plusieurs mètres, au cours de la saison hivernale. Du fait de cet hiver long et rigoureux, la pression pastorale s'étale seulement sur environ 4 mois. La pluviosité est élevée, au moins 2 m par an, ce qui se traduit par une tendance à l'acidification de sols. A l'échelle du bassin versant, une histoire géologique complexe a permis la mise en place de différents substrats et unités géomorphologiques, supports de plusieurs types de sols et de conditions différenciées d'écoulement de l'eau, de relations sol/végétation.

#### **III.2. Caractéristiques géomorphologiques**

Le site de Bise présente une géomorphologie bien particulière. Une butte morainique marque une moraine de fond, constituée d'éléments grossiers de taille variable, englobés dans



Figure 18 : Le site de Bise (en rouge)

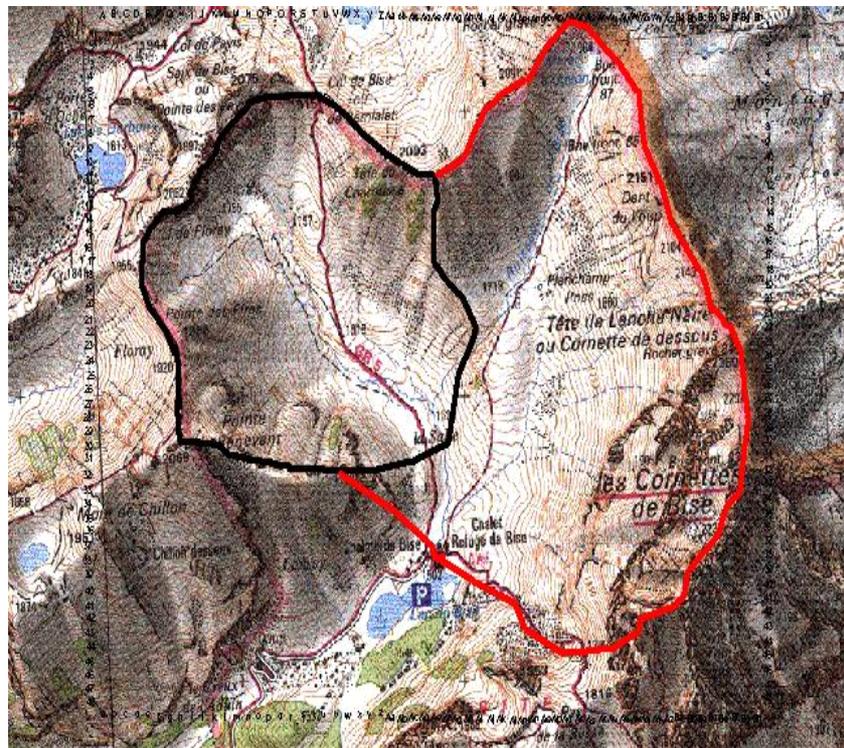


Figure 19 : Carte IGN au 1/25000ème du bassin versant de Bise avec ses deux sous-bassins (en rouge, sous-bassin est ; en noir, sous bassin versant ouest)

une matrice limono-sableuse compacte. Les matériaux colluvionnaires fins (limon argileux) tapissent les zones concaves de bas de pente et les fonds de talwegs. Les escarpements rocheux qui entourent l'alpage sont des parois de calcaires durs (Malm) atteignant plusieurs centaines de mètres de hauteur (Cornettes de Bise, Pointe des Pavis...). Elles sont à l'origine des éboulis qui recouvrent la majeure partie des flancs de l'alpage. Ces éboulis forment des pentes plus ou moins régulières selon la nature des matériaux. Ainsi, les éboulis de Malm sont très perméables, leurs produits d'altération ne contiennent pratiquement pas de terre et sont le support d'une végétation en équilibre avec les conditions de l'éboulis. Dans ces conditions, les mouvements latéraux d'éléments et de particules carbonatés permettent de neutraliser l'acidification du sol (Legros *et al.*, 1987).

Les altérites des éboulis liasiques sont moins perméables, plus riches en matériaux fins (limons constitués de minéraux silicatés) et supportent une végétation plus riche. L'eau de pluie a alors tendance à ruisseler et à creuser de petits chenaux qui donnent un aspect strié à l'éboulis.

En bas de pente, au niveau des torrents, on observe des cônes de déjection. Les lits des cours d'eau moins pentus sont recouverts d'alluvions récentes. On retrouve des dépôts alluviaux et torrentiels d'autant plus anciens que l'on s'éloigne du cours d'eau. On observe également des cordons morainiques qui constituent une trace des dernières glaciations. Elles sont en général formées de matériaux filtrants facilitant l'acidification. Le marais en aval des chalets de Bise a lui aussi une origine glaciaire ; il s'agit d'un surcreusement glaciaire aussi appelé ombilic (zone de roches tendres). Celui-ci est situé en amont d'un verrou glaciaire (zone de roches plus dures).

En amont des chalets, aux abords du cours d'eau, le versant présente une morphologie en « terrassettes », dues au passage répété du troupeau lors de son trajet entre l'étable et l'alpage.

### III.3. Contexte agropastoral

L'alpage est pâturé du début du mois de juin à la fin du mois de septembre. Durant cette période, deux troupeaux d'une quarantaine de têtes chacun parcourent les 2 vallons est et ouest du bassin versant de Bise (300 hectares). Les deux exploitations ont une gestion de l'atelier laitier semblable. En effet, les vèlages sont prévus pour la période hivernale durant laquelle les vaches sont à l'étable. Il en résulte que la production laitière moyenne décroît tout



au long de la saison estivale (passant de 600 litres à 200 litres par jour et par exploitation). Les besoins nutritifs des animaux diminuent donc au cours de l'été et le berger adapte les besoins du troupeau à l'évolution de la quantité et la qualité des ressources fourragères des différentes zones de l'alpage.

Le circuit de pâturage est structuré par les éléments suivants :

- deux axes de déplacement collectif des animaux : (i) le premier longe la portion aval du cours d'eau et permet la liaison entre les bâtiments et les quartiers de pâturage ; (ii) le second connecte les surfaces fourragères aux écoulements permanents localisés au niveau des pentes à colluviums, en amont par rapport au cours d'eau. Ces zones de déplacement collectif marquées une morphologie en terrassettes offre un sol fréquemment mis à nu par le piétinement des animaux ;

- une zone de franchissement du cours d'eau et d'abreuvement du troupeau, localisé à l'aval du cône de déjection du sous bassin Ouest ;

- des quartiers de pâturage surveillé : (i) en début de saison, ils sont situés sur les secteurs proches du fond de vallon (moraine et bas de cône de déjection) ; (ii) à partir du mois d'août, lorsque les réserves fourragères du bas sont épuisées, ils concernent des stations plus élevées (colluvium et jupes d'éboulis) ;

- des quartiers de pâturage autonome et des reposoirs non surveillés, généralement très limités aux fonds de vallon ;

- des zones de pâturage autonome nocturne, à proximité des bâtiments.

#### III.4.Relations sol-végétation

A l'échelle de l'alpage, sous l'effet du parcours des troupeaux, on assiste à une concentration des déjections et nutriments en fond de vallon et à une eutrophisation des groupements végétaux accentuée dans les sites d'accumulation d'eau. Cette redistribution d'éléments nutritifs s'effectue au détriment des pentes et secteurs périphériques de l'alpage où, en l'absence de recharge calcaire par les transferts de versants, les types végétaux évoluent vers des types oligotrophes acidifiés. Plusieurs types de végétation ont été reconnus et référencés vis à vis de la typologie des alpages des Alpes humides (Bornard & Dubost, 1992 ; Dorioz & Party, 1987, Dorioz, 1987) :

- Pelouses maigres acidophiles (qualifié de « *Nardus* »). Il s'agit de stations



typiquement appauvries en éléments nutritifs, où l'on retrouve *Nardus stricta* et *Descampsia flexuosa* mais aussi *Gentiana purpurea*. Le régime hydrique est parfois mésoxérophile du fait de la structuration microporeuse des sols (Van Oort & Dorioz, 1991). L'acidification prononcée des sols avec accumulation de matière organique en surface contribue à la faible productivité de ces pelouses (< 2 t de M.S. ha<sup>-1</sup> sur le premier cycle de végétation avec des repousses très lentes). L'intensité du pâturage de ces pelouses est faible du fait de la faible appétence du troupeau pour des espèces dominantes telles le Nard raide. Ces pelouses acidophiles sont de moins en moins exploitées et évoluent lentement vers des landes à Ericacées.

- Landes ouvertes à Ericacées. Dans ces milieux très acides dominent les Myrtilles et les Rhododendrons. Ces zones se caractérisent par une pression pastorale quasi nulle depuis plusieurs décennies. L'évolution naturelle peut conduire à une fermeture de la lande qui ne présente plus aucun intérêt pastoral.

- Pelouses moyennes sèches calcicoles. Ce type est caractérisé par *Carex sempervirens* et *Sesleria coerulea*. Il est localisé au niveau des affleurements où l'on retrouve souvent *Lotus corniculatus*. Les sols sont humiques à régime hydrique méso à xérophile. La productivité est faible et valeur pastorale est moyenne. Paradoxalement, ces pelouses sont reconnues d'intérêt pour la saveur des fromages.

- Pelouses à pâturin des alpes (qualifié dans cette thèse de « *Poa* » du fait de sa morphologie). La végétation est dominée par des graminées et des légumineuses à forte valeur pastorale. La production de biomasse est moyenne ; la fréquentation est précoce et intense ; il y a équilibre entre exportation de biomasse et apports d'éléments nutritifs par les bouses. Ces pelouses tapissent le fond de vallon, notamment la partie basale du cône de déjection.

- Pelouses grasses mésophiles (qualifié de « Trisetè »). Ce type de végétation à base de *Trisetum flavescens*, supportent de nombreuses graminées fourragères et légumineuses et présente une forte biomasse, bien que les restitutions par les déjections soient faibles. Localisé au niveau des pentes d'éboulis stabilisés, ce type est associé à des sols bruns calciques et résulte de phénomènes de chaulage naturels, dus aux apports gravitaires amont de matériaux carbonatés.

Tableau 10 : Propriétés et de la valeur fourragère des principales stations de l'alpage de Bise.

	Hautes herbes à Rumex	Gazon à Paturin	Hautes herbes à Trisète et Géranium	Gazon à Nard (nardaie)	Landes à Ericacées
Fonction pastorale	Reposoir	Pâturage intensif et précoce	Pâturage extensif et tardif	Pâturage extensif	Passage
Productivité	Maxi	Moyen	Maxi	Faible	Faible
Retour au sol biomasse Epigée (%)	100	10-20	50-80	80-100	100
Prélèvement par pâturage	Faible	Maxi <i>Forte appétence</i>	Moyen-faible <i>Appétence faible au delà de juillet</i>	Faible <i>Appétence faible</i>	Nul
Légumineuses (%)		10-20	10	5	0
Déjections (intensité)	Maxi	Moyen	Moyen-faible	Faible	Episodique
Bilan agronomique	Excédentaire	Deficitaire en P	Equilibré à un peu excédentaire	Deficit en N	Deficit en N
SOLS (eau, réserves en bases)	Sols divers	Sols bruns calciques alluviaux <i>(souvent irrigation topographique)</i>	Sols bruns calciques	Sols bruns acides sur moraines et sur lias en place <i>(RU faible ?)</i>	Sols bruns ocreux sur lias en place

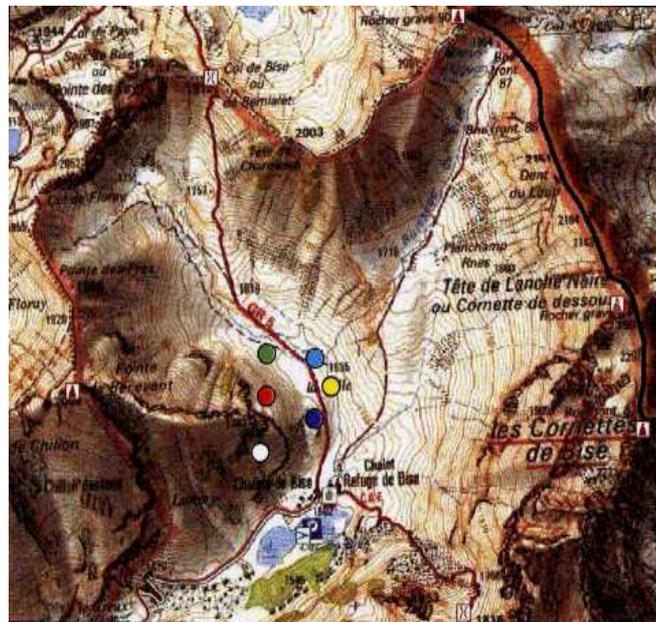


Figure 20 : Carte représentant les différentes stations pastorales : la station *Poa* en vert, la station *Rumex* en jaune, la station *Nardus* en bleu foncé et la station *Caltha* en bleu clair. En rouge et en blanc sont représentées la pente à Trisète et un pelouse sèche calcicole.

- Pelouses nitrophiles à *Rumex alpinus* (qualifié de « *Rumex* »). Il s'agit de zones de reposoir avec une concentration des déjections qui confère un caractère nitrophile prononcé à la végétation. Ces zones sont souvent localisées dans des situations hydromorphes. Entre les touffes de *Rumex*, des graminées fourragères peuvent subsister, ce qui, localement, peut être suffisant pour maintenir une certaine valeur pastorale à cette végétation ; ceci différencie ces stations de reposoir du véritable rumicion, localisé à l'aval des chalets d'alpage où le recouvrement par le *Rumex* est complet.

- Zones humides (qualifiée de « *Caltha* ») : Il s'agit de marais aux sols hydromorphes peu profonds et humifères, liés aux résurgences ou à des concentrations d'eaux de surface. La végétation est marquée par un cortège de plantes des milieux humides, de faible valeur pastorale. Dans ces milieux, le pâturage est irrégulier et souvent en lien avec les conditions climatiques.

Des relevés de végétations au sein de différentes stations de l'alpage ont été effectués durant l'été 2005 et sont présentés à l'annexe I. Le Tableau 10 expose les propriétés et de la valeur fourragère des principales stations de l'alpage de Bise. Au cours de cette thèse, 4 de ces stations ont été retenues (*Poa*, *Rumex*, *Nardus* et *Caltha*), principalement en fonction de leur caractère ouvert ou confiné. Leur localisation au sein de l'alpage est présentée Figure 20.

### III.5. Quelques données sur l'hydrodynamique des stations pastorales retenues

Les écoulements sur l'ensemble du bassin versant ont un débit important durant la fonte des neiges et lors des périodes de forte activité hydrologique de la saison estivale. Ils traversent les formations superficielles en demeurant à leur surface pour rejoindre l'exutoire du bassin (Drevet, 2004).

#### III.5.1. La station *Poa*

Les sols de cette station présentent une forte charge en cailloux (> 50 %), à laquelle est associée une forte porosité, avec des cavités entre les éléments grossiers ; la perméabilité y est très élevée ( $K=127 \text{ mm h}^{-1}$ ). Dans cette station, les flux d'eau sont donc intenses et confèrent



un caractère non confiné, « ouvert » au milieu. Le caractère non confiné suggère que les flux d'eau se connectent rapidement à l'exutoire du bassin versant.

### III.5.2. La station *Rumex*

Dans cette station, les conditions de sol sont très tranchées avec (i) une sous unité centrale confinée, caractérisée par une forte hydromorphie et la réduction du fer (*Rumex* réduit) et en périphérie (ii) des sols « ouverts » dont le fonctionnement est marqué par un intense écoulement de nappes perchées (*Rumex* oxydé).

### III.5.3. La station *Caltha*

Cette zone hydromorphe résulte de l'affleurement de nappes alluviales qui accompagnent le cours d'eau lorsque ce dernier franchit des zones relativement plates. Les tourbes y sont peu épaisses (10 à 20 cm) et, la matière organique englobe les graviers et les matériaux grossiers alluviaux. Les eaux étant riches en calcium, ses tourbes sont formées à partir d'accumulation de matière eutrophe, comme en témoigne une capacité d'échange cationique, un taux de saturation élevé et un pH proche de la neutralité.

### III.5.4. La station *Nardus*

La *Nardus* est le siège d'un départ latéral intense de composés minéraux lors de la fonte des neiges et des fortes averses de la saison pastorale. Cumulé sur des millénaire ou des siècles cela conduit à l'acidification des profils de sol et à un transfert du fer. Ainsi, dans cette station, le pH très bas, avec de fortes teneurs en aluminium.

L'ensemble des caractéristiques de ces sols est donné dans le chapitre 2 et annexe I.

Dans ce contexte de prairie, les sols et les stations pastorales sont connectés au cours d'eau en fonction des conditions météorologiques et de l'état d'humidité des sols, et peuvent l'alimenter lors de situations où le ruissellement est intense. L'étude de la dynamique des

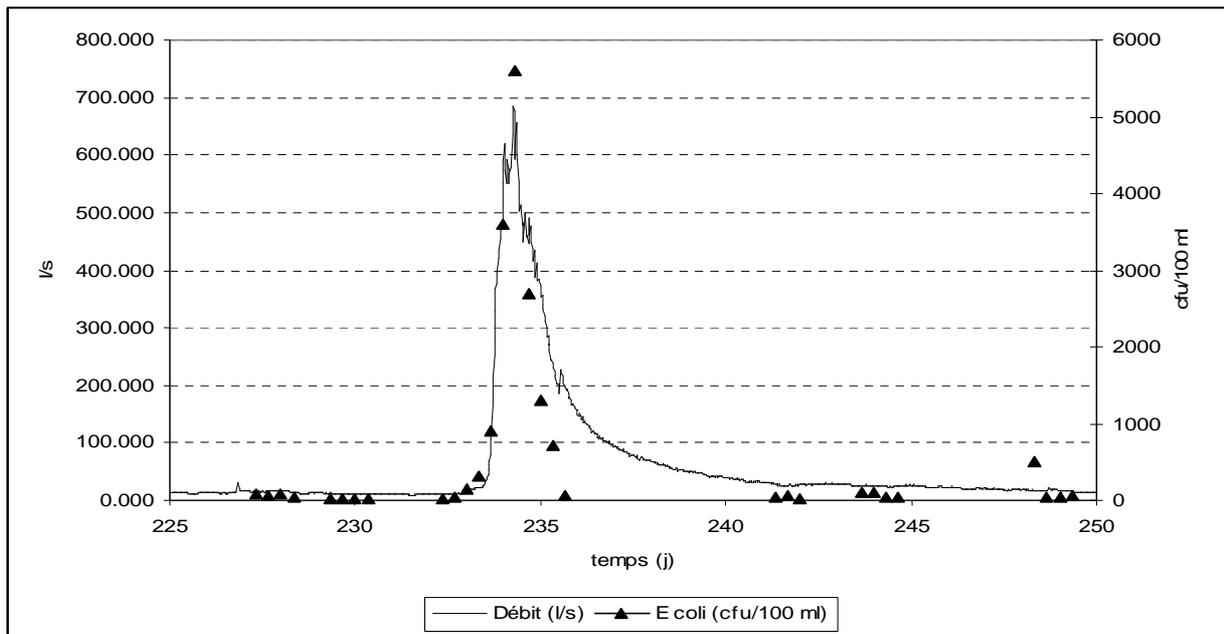


Figure 21 : Débit et concentration d'*E. coli* (prélèvements automatiques) à l'exutoire du bassin versant en fonction de la date (jour julien).

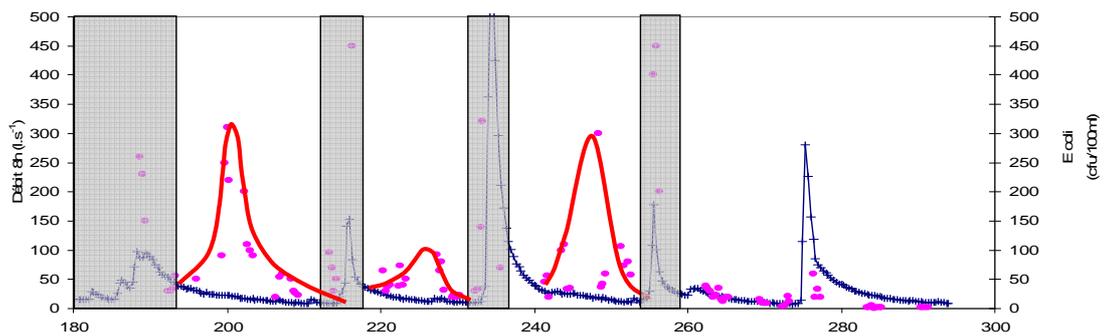


Figure 22 : Concentrations en *E. coli* (prélèvements automatiques) durant les périodes inter-crués en fonction de la date (jour julien). En grisé, périodes de ruissellement. Traits fins : débit ; trait plein ajustement sur données *E. coli*. L'échelle des teneurs en *E. coli* est tronquée à 500 UFC 100 ml<sup>-1</sup> ; la valeur maximale enregistrée est de 5600 UFC 100 ml<sup>-1</sup>.

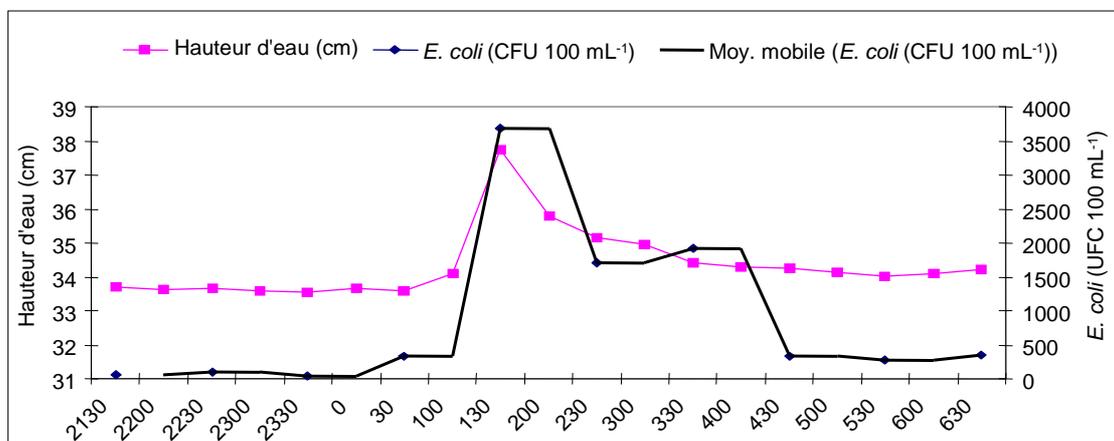


Figure 23 : Concentrations d'*E. coli* dans l'eau lors d'une crue, exprimées en UFC 100 ml<sup>-1</sup> d'eau

populations bactériennes à l'exutoire du bassin versant permet d'appréhender le fonctionnement du système étudié reliant le troupeau à l'eau.

#### **IV. Dynamique d'*E. coli* dans l'eau de surface à l'exutoire du bassin versant**

Le suivi de la dynamique d'*E. coli* dans l'eau à l'exutoire a été réalisé dans le cadre du projet Pastor (programme GESSOL2, MEDAD). Ce projet a pour but d'étudier l'impact du fonctionnement du système agropastoral du bassin versant sur les flux bactériens et les conséquences sur la dégradation de la qualité microbiologique de l'eau. Pour ce faire, deux approches ont été réalisées. La 1<sup>ère</sup>, présentée dans ce manuscrit de thèse, était basée sur l'étude d'*E. coli*, indicateur de contamination fécale. La 2<sup>nde</sup> a reposé sur la recherche des STEC, les *E. coli* pathogènes et producteurs de shigatoxines (Frémaux, 2007).

Dans le cadre de ce projet de recherche, différents comportements d'*E. coli* à l'exutoire ont été révélés :

-Au début d'averse, un pic en concentration d'*E. coli* est généralement observé. Cette augmentation des concentrations est due à des écoulements liés au ruissellement de surface (Figure 21).

-Durant la saison pastorale et en période d'étiage, des pics de concentrations sont parfois détectés et correspondent à des apports directs de bouses dans le cours d'eau (Figure 22).

-Lors de crues, les concentrations en *E. coli* augmentent fortement et peuvent atteindre plus de 5000 UFC 100 mL<sup>-1</sup> d'*E. coli*. Leur ampleur de cette augmentation dépend de l'intensité de la crue et de la hauteur d'eau nécessaire pour obtenir la saturation des sols et le déversement vers le cours d'eau des eaux de ruissellement. Dix à quinze jours après le retour à l'étiage, des pics d'effectifs en *E. coli* sont observés (Figure 23). Cette élévation de la concentration en *E. coli* est liée à des transferts profonds dans les sols filtrants comme le sol sous *Poa*.

Ces variations de concentrations d'*E. coli* dans l'eau lors d'épisode pluvieux et de crues laissent supposer que des réservoirs sont mobilisés vers le cours d'eau. Il est alors nécessaire de déterminer si seules les bouses participent à la contamination du cours d'eau ou si les sols constituent également des réservoirs environnementaux en *E. coli* qui pourraient être susceptibles être mobilisés en fonction de l'hydrodynamiques des sols.



## **Chapitre 2 :**

### **Les effectifs bactériens dans les bouses et les différents sols du bassin versant de l'alpage de Bise**



## Avant-propos du chapitre 2

La survie d'*E. coli* d'origine fécale dans l'environnement est essentiellement étudiée suite à l'épandage de matière organique fécale telle que le fumier et le lisier. Par contre, très peu de données sont actuellement disponibles concernant leur survie dans des sols sous pâture, or les entrées de bactéries fécales y sont importantes. Le but général de ce chapitre est d'apporter de nouvelles connaissances sur l'écologie des *E. coli* dans les sols des écosystèmes pâturés subalpins. Ces sols sont particuliers car soumis à des conditions pédoclimatiques et des relations avec la végétation propres à l'étage subalpin. Dans ce chapitre, la dynamique des populations de contaminants fécaux est étudiée : (i) à l'entrée du système c'est-à-dire dans les bouses, considérées comme habitat primaire d'*E. coli*; (ii) dans une zone de transit, les sols, considérés comme habitat secondaire et transitoire et; (iii) à l'exutoire du système, dans l'eau. L'étude des fluctuations spatio-temporelles des effectifs des populations d'*E. coli* nous permet d'évaluer: (i) si des transferts d'*E. coli* des bouses vers et au travers des sols sous-jacents existent, (ii) si la rhizosphère constitue un réservoir environnemental en *E. coli* et (iii) si la pression de pâture joue un rôle sur l'abondance des populations d'*E. coli* dans le sol.

Deux approches ont été développées. La 1<sup>ère</sup> approche (diachronique) est une approche spatio-temporelle, à l'échelle de la parcelle, qui consiste à évaluer la dynamique des populations d'*E. coli* dans les bouses et les sols sous-jacents dans différentes situations pastorales.

Une 2<sup>nde</sup> approche (synchronique) consiste à étudier les effectifs d'*E. coli* dans la rhizosphère de différentes stations pastorales au cours d'un cycle de végétation entier pendant certaines périodes clés, *i.e.* lors de la saison pastorale, en hiver sous le manteau neigeux et au printemps à la fonte des neiges.

Les dynamiques de populations d'*E. coli* observées sont comparées à celles des *Pseudomonas* spp. fluorescents, représentant des populations adaptées au sol de façon à évaluer si les populations d'*E. coli* sont capables de s'adapter aux conditions environnementales rencontrées dans le sol et si des phénomènes de compétition existent entre populations contaminantes et résidentes.

Ce chapitre s'organise en 3 parties: la 1<sup>ère</sup> partie est un article, accepté dans *Journal of Environmental Quality*, dont l'exposé est centré sur les résultats des dénombrements d'*E. coli* dans les bouses et les sols de l'alpage de Bise. La 2<sup>nd</sup> partie présente les résultats obtenus concernant les effectifs des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents au sein des mêmes



compartiments. Enfin, la 3<sup>ème</sup> partie discute des possibilités d'interactions entre *E. coli* et *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le sol.

Brièvement, les principaux résultats montrent que la rhizosphère (0-5 cm) est un réservoir environnemental permanent (et non transitoire comme initialement supposé) en *E. coli* avec des effectifs stables tout au long du cycle de végétation, suggérant une adaptation de certaines populations d'*E. coli* au sol. De plus, le transfert d'*E. coli* sous l'horizon de surface serait lié au fonctionnement hydrologique des différents sols, notamment à leur nature drainante (ou « ouverte ») versus confinée. Les *Pseudomonas* fluorescents spp. présentent, quant à eux, des effectifs présentant une variabilité saisonnière plus importante, en relation directe avec le cycle de végétation. Ces deux populations ne semblent pas coloniser le même micro-habitat. Contrairement aux populations rhizosphériques de *Pseudomonas* fluorescents qui colonisent préférentiellement les racines des plantes, les populations d'*E. coli* seraient plutôt localisées dans la microporosité du sol et seraient ainsi à l'abri de toute interaction négative de prédation ou de compétition avec la microflore tellurique. Les *E. coli* apportés par le pâturage présentent donc des comportements différents de ceux observés suite aux épandages d'effluents d'élevage puisque, dans ce dernier cas, un déclin des populations d'*E. coli* est généralement observé.



# **Les effectifs bactériens dans les bouses et les différents sols du bassin versant de l'alpage de Bise**

## **I. Persistence of culturable *Escherichia coli* contaminants in dairy alpine grassland soils (Texier S., C. Prigent-Combaret, M.H. Gourdon, M.A. Poirier, P. Faivre, J.M. Dorioz, J. Poulenard, L. Jocteur-Monrozier, Y. Moenne-Loccoz, D. Trévisan., J. Environ. Qual., 2008, 37:2299-2310)**

### I.1. Abstract

Our knowledge of *E. coli* ecology in the field is very limited in the case of dairy alpine grassland soils. Here, our objective was to monitor field survival of *E. coli* in cow pats and underlying soils in four different alpine pasture units, and to determine whether the soil could constitute an environmental reservoir. *E. coli* was enumerated by MPN using a selective medium. *E. coli* survived well in cow pats ( $10^7$  to  $10^8$  cells  $g^{-1}$  dry pat), but cow pats disappeared within 2 months. In each pasture unit, constant levels of *E. coli* ( $10^3$  to  $10^4$  cells  $g^{-1}$  dry soil) were recovered from all topsoil (0-5 cm) samples regardless of the sampling date i.e. under the snow cover, immediately after snow melting, or during the pasture season (during and after the decomposition of pats). In deeper soil layers below the root zone (5-25 cm), *E. coli* persistence varied according to soil type, with higher numbers recovered in poorly-drained soils ( $10^3$  to  $10^4$  cells  $g^{-1}$  dry soil) than in well-drained soils ( $<10^2$  cells  $g^{-1}$  dry soil). A preliminary analysis of 38 partial *uidA* sequences of *E. coli* from pat and soils highlighted a cluster containing sequences only found in this work. Overall, this study raises the possibility that fecal *E. coli* could have formed a naturalized (sub)population, which is now part of the indigenous soil community of alpine pasture grasslands, the soil thus representing an environmental reservoir of *E. coli*.

### I.2. Introduction



Fecal microbial contamination of water is considered a world wide problem for public and animal health, and the presence of fecal bacteria has been monitored in various water bodies (Muirhead *et al.*, 2006a; George *et al.*, 2004; Celico *et al.*, 2004; Entry *et al.*, 2001; Cassell *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2000). Often, fecal bacteria involved in water contamination originate from farmlands (Jamieson *et al.*, 2002), where they have been deposited by feces (i.e. in pastures) or spreading of manure, as both contain high amounts of fecal bacteria and potential human pathogens (Avery *et al.*, 2004; Ogden *et al.*, 2002; Gagliardi and Karns, 2000; Faust *et al.*, 1982). Survival of fecal bacteria in soil will be an important factor determining the extent of subsequent stream contamination.

Soil survival of fecal contaminants such as *E. coli* has been mainly assessed in the case of manure or sludge application, which leads to the spread of fecal matter and associated bacteria onto large field surfaces. Despite the fact that survival of fecal bacteria is favored in soils with higher organic matter content (Oliver, 2005a; Crane *et al.*, 1983), it appears that survival of *E. coli* added with manure or sludge contaminants is generally limited in planted soil (Williams *et al.*, 2007; Tyrrel and Quinton, 2003; Trevisan *et al.*, 2002; Chandler *et al.*, 1981). The presence of plants has a major impact on the ecology of bacteria in soil (Troxler *et al.*, 1997). On one hand, the rhizosphere is a microbial habitat receiving significant amounts of organic substrates as root exudates, leading to proliferation of a wide range of root-colonizing bacteria e.g. fluorescent pseudomonads (Troxler *et al.*, 1997). On the other hand, many root-colonizing bacteria produce antibiotics, which can affect (via competition and/or antagonism) the survival of other bacteria, including enterobacteria such as *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (now *Pectobacterium carotovorum*) and *E. coli* (Cronin *et al.* 1997; Keel *et al.*, 1992).

Unlike bacterial inputs due to manure spreading, the introduction of *E. coli* into the soil environment by feces takes place over the whole pasture season, which corresponds to the growing period of vegetation. In addition, cow pats are not uniformly distributed on the soil surface. After feces deposition on the soil surface, fecal bacteria remain within the cow pat during its transformation/decomposition. They come progressively in contact with the underlying plants and topsoil, insects and worms playing an important part in this process (Gobat *et al.*, 1998). This should provide more favorable conditions for survival of fecal *E. coli* in the soil environment. To our knowledge, the only study that dealt with the persistence of *E. coli* and other fecal coliforms introduced by feces in pasture soils was that of Avery *et al.* (2004), which evidenced fecal *E. coli* in soil up to 168 days after short-term grazing.

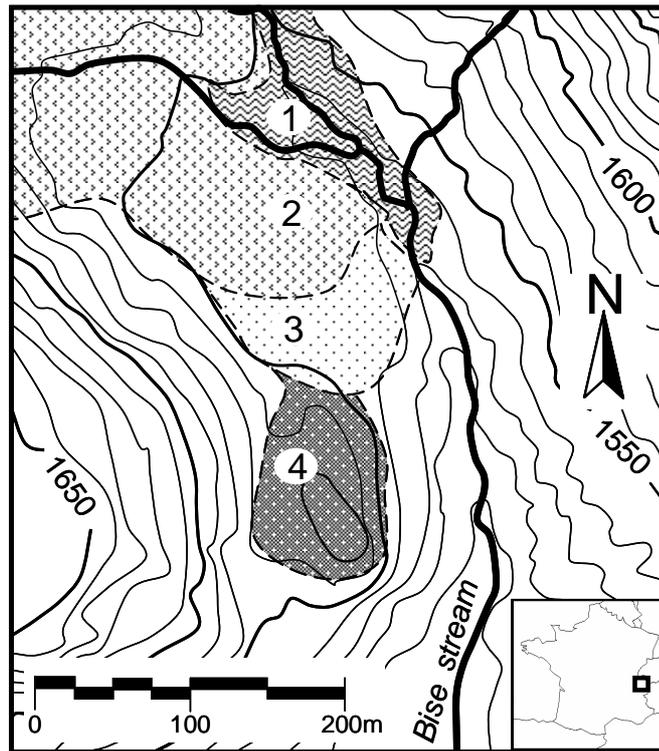


Figure 24 : Geographic location of the Bise watershed and of the *Caltha* (1), *Poa* (2), *Rumex* (3) and *Nardus* (4) grasslands.

In the case of a pasture area, fecal contamination of water may arise not only from direct deposition of feces in streams, but also from leaching through contaminated soils and from surface runoff of fecal material previously deposited on soil surface (Entry *et al.*, 2001). This is particularly important in the case of mountainous grasslands, because these processes are drastically enhanced by slope and rainfall patterns. For instance, in the particular context of the Alps, grazing of steep pastures by cattle has been going on for centuries, and fecal contamination of streams has become a major concern for drinking water, cheese making and recreational activities. Despite the fact that mountain pastures provide maximal conditions for water contamination, it appears however that survival of *E. coli* fecal contaminants in this type of grassland has not been studied yet.

The issue of *E. coli* survival in alpine grasslands is rather complex, because (i) these pastures are also used as natural habitat by wild fauna and (ii) different ecological units can be found within a given alpine watershed. These units typically differ in terms of slope, microclimatic conditions, soil type, and soil water dynamics. This can lead to different types of plant communities and pasture practices, because the level of grazing by herds depends on appetite of the plant cover. These differences between pasture units are likely to be relevant not only in terms of cow pat input, but also for survival conditions of *E. coli* in underlying soil. However, it is also likely that survival of *E. coli* in different alpine pastures will share common features. Our first hypothesis is that cow pat material should provide favorable conditions for survival of fecal *E. coli* and serve as a source for subsequent contamination of underlying plants and soil. The second hypothesis is that *E. coli* numbers should be subsequently higher in the soil immediately below cow pats in comparison with (i) topsoil not covered by a cow pat as well as (ii) deeper soil layers, as roots in alpine grasslands are mostly present in the topsoil. The third hypothesis is that winter should eliminate most if not all *E. coli* released by cattle during the pasture season, as *E. coli* is sensitive to cold and freezing/thawing cycles (Weiser and Osterud, 1945).

The goal of our work was to assess field survival of *E. coli* fecal contaminants in cow pats and soil in alpine grasslands, and to determine whether the rhizosphere could constitute an environmental reservoir for these bacteria. To this end, an alpine watershed presenting different soil characteristics and plant communities was chosen as a model site to study the persistence of culturable *E. coli* in pasture soils. The survival and transfer of *E. coli* from cow pats to the underlying or neighboring rhizosphere layer and in subsoil layer (mostly root-free) were monitored during 1.5 years and compared to those of the fluorescent *Pseudomonas* spp., which were used as non-fecal model of rhizosphere-adapted indigenous bacterial populations

Table 11. Physicochemical and main soils characteristics of the different pasture units and dominant species in the plant community. The soils are classified according to the USDA soil taxonomy (Soil survey staff, 2006)

	<i>Poa</i> grassland		<i>Rumex</i> grassland			<i>Caltha</i> grassland		<i>Nardus</i> grassland	
	0-5 cm	5-25 cm	0-5 cm	5-25 cm		0-5 cm	5-25 cm	0-5 cm	5-25 cm
			cm	Oxidized	reduced				
Clay (%)	42.9	32.0	59.6	27.2	59.2	34.9	19.0	31.2	32.1
Silt (%)	42.2	37.6	38.0	49.3	36.6	40.5	29.7	52.2	48.9
Sand (%)	14.9	30.4	2.4	23.5	4.2	24.6	51.3	16.6	19.0
Texture	Silty clay	Clay loam	Clay	Loam	Clay	Clay loam	Loam	Silty clay loam	Silty clay loam
Organic carbon (g kg <sup>-1</sup> )	85.4	22.8	58.4	31.1	43.0	142	25.4	96.5	17.0
C:N ratio	10.7	9.5	10.5	10.0	9.5	11.6	11.7	11.0	11.0
Cationic exchange capacity (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	22.3	20.8	33.9	6.4	35.0	56.1	15.6	9.8	7.9
Base saturation (%)	98	100	100	81	100	100	100	44	11
Al <sup>3+</sup> (cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.16	0.02	0.03	1.46	0.03	0.07	0.03	1.11	7.62
pH	5.0	8.1	6.9	4.8	6.7	6.8	7.3	4.7	4.0
Presence of roots	Many	Some	Many	Few	Few	Many	Few	Many	Many
Vegetation	<i>Poa alpina</i> ; <i>Festuca rubra</i> ; <i>Cynosurus cristatus</i> ; <i>Plantago major</i> and <i>P. montana</i> ; <i>Trifolium campestre</i> , <i>T. pratense</i> and <i>T. repens</i>		<i>Rumex alpinus</i> ; <i>Agrostis tenuis</i> ; <i>Phleum alpinum</i> ; <i>Trifolium pratense</i>			<i>Caltha palustris</i> ; <i>Chaerophyllum hirsutum</i> ; <i>Mentha sylvestris</i> ; <i>Rumex alpinus</i> ; <i>Senecio alpinus</i>		<i>Nardus stricta</i> ; <i>Arnica montana</i> ; <i>Gentiana purpurea</i> ; <i>Deschampsia flexuosa</i> ; <i>Campanula barbata</i>	
Soil taxonomy (soil survey staff, 2006) and main characteristics	typic haplocryept High gravel fraction and high saturated permeability (K=127 mm h <sup>-1</sup> )		typic epiaquept well oxygenated subsoil layer subsoil acidity	typic endoaquept poorly oxygenated subsoil layer	typic humaquept high water and organic contents	spodic dystrocryept soil acidity			

(i.e. control). Since *E. coli* is commonly used as an indicator of fecal contamination in microbiological analyses of water, the implications of the current results for risk assessment of water quality were also considered.

### I.3. Material and Methods

#### I.3.1. Site description

The study took place in the mountain pasture of Bise (French Alps, Haute-Savoie; Figure 24) located on a 4-km<sup>2</sup> watershed. The altitude is between 1500 and 2000 m and the soil is covered with snow during 6 months. Relationships between soil, vegetation and cow grazing have been described by Dorioz and Party (1987). In the first part of the 20<sup>th</sup> century, the Bise pasture was an important forage resource for the farming systems of the surrounding valleys; 350 cows used to migrate up there for summer. Pasture exploitation has diminished in the 1950's and currently only 80 dairy cows graze on this area, from mid June to mid September.

#### I.3.2. Pasture units

Four small areas (< 1 ha) were selected. They correspond to different types of pasture units, with different ecological attributes such as specific soil functioning and dominant plant species. The first unit is a *Nardus* grassland, which is dominated by *Nardus stricta* (i.e. mat-grass), a well-known graminaceae growing under cold climate (Barrio et al., 1997). The second unit is a *Poa* grassland, with a mesotrophic vegetation rich in clover (*Trifolium repens*). The third pasture unit is a *Caltha* grassland, dominated by *Caltha palustris*. The fourth unit is a *Rumex* grassland. This area receives frequent cow pat inputs, which favors nitrophilic species such as *Rumex alpina*. The physicochemical properties and main soils characteristics are described in Table 11.

In 2006, cow pat inputs were estimated in the four pasture units by counting each week the surface covered by cow pats on a selected 400-m<sup>2</sup> area, from mid June to the end of August.

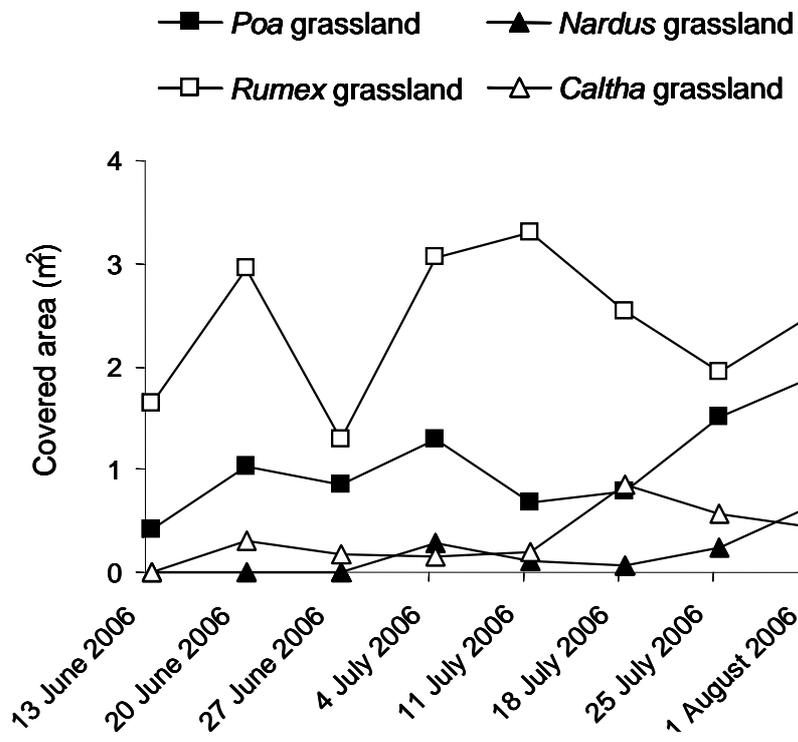


Figure 25 : Soil coverage by cow pats (m<sup>2</sup>) in a plot of 400 m<sup>2</sup> for each pasture unit studied.

### I.3.3. Sampling of soil and cow pats

Soil samples were cored horizontally with an auger (5 cm in diameter × 20 cm long) from a 20 cm-wide trench. For each soil sample, three 50-cm<sup>3</sup> soil cores were mixed together in a sterile plastic bag. Soils were collected with ethanol-treated clean tools and stored at 4°C overnight before analysis. Cow pat material (100 cm<sup>3</sup> per pat) was collected with clean gloves and stored in sterile bags at 4°C overnight before analysis.

### I.3.4. Synchronic assessment

Considering that fecal bacteria are deposited onto soil through occasional inputs, two sampling methods were developed to study the survival of fecal *E. coli*. The first one was a synchronic approach, in which *E. coli* stocks were evaluated in each of the four pasture units during winter (under the snow cover ; January 2006), immediately after snow melting (May 2006) and in summer (August 2006). Topsoil was collected between cow pats (4 samples in January and May, and 8 in August for each pasture unit). In addition, during summer 2006, 8 topsoil samples were also taken from two higher, steep areas frequented exclusively by wild fauna (noticeably ibex, marmot, and fox), i.e. not grazed by cattle. In the *Rumex* grassland, topsoil samples were collected both in the flat, endoreic area (above the *Rumex*/reduced subsoil) and in the peripheral, convex area (above the *Rumex*/oxidized subsoil).

### I.3.5. Diachronic assessment

The second experimental approach was a diachronic assessment, which aimed at assessing the dynamics of *E. coli* stocks in time, after the deposit of cow pats. The survival of fecal *E. coli* was studied within cow pats and in different soil layers, to gain insight into the transfer of these bacteria from cow pat to soil. In 2005, samples were collected in the four pasture units every two weeks during the pasture season (from mid June to the end of August). Three cow pats and associated sets of soil samples were collected per pasture unit. Soil samples were taken in the soil layer (0-5 cm) immediately under cow pats (“topsoil”) and

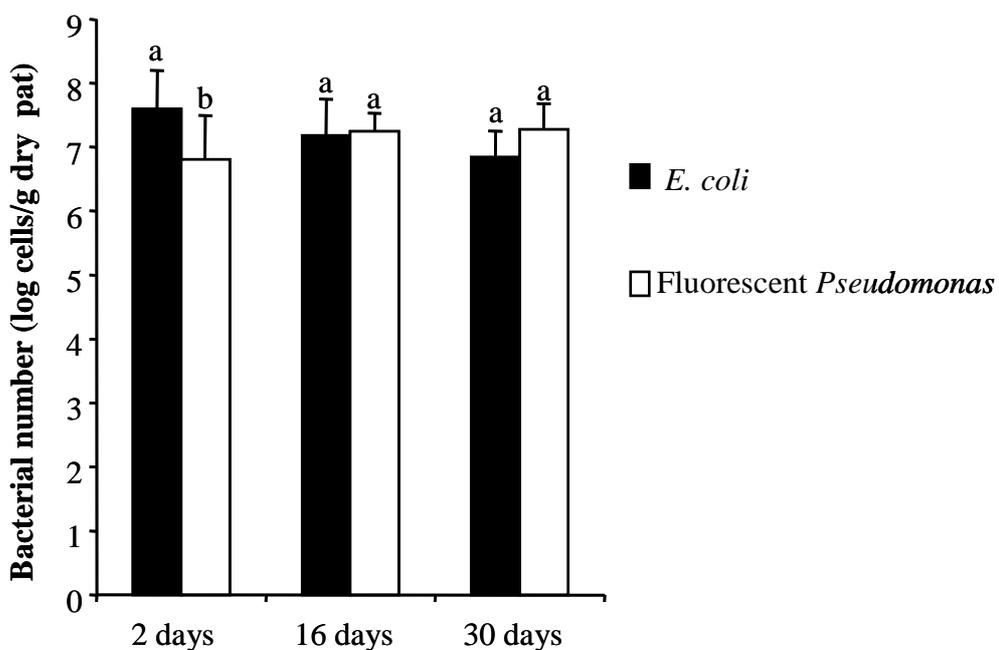


Figure 26 : Numbers of *E. coli* and fluorescent *Pseudomonas* (means  $\pm$  standard deviation; n = 24 cow pats) in cow pats in the Bise watershed according to pat age. The same cow pats were sampled at the three dates. Results are expressed as log cells  $g^{-1}$  dry matter to permit the comparison with soil. At each date, the statistical relationship (ANOVA) between both bacterial numbers is indicated by letters a and b ( $P < 0.05$ ).

1 m downhill from the cow pats (“downhill topsoil”). Under cow pats, additional samples were collected in the layer between 5 and 25 cm (“subsoil”). In 2006, the same sampling scheme was implemented, except that (i) only *Rumex* and *Poa* grasslands were investigated, (ii) 4 sets of samples instead of 3 were studied per pasture unit, (iii) samples were collected every four weeks, (iv) downhill subsoil layers were also sampled, and (v) the monitoring was continued in autumn after the departure of the herd.

At the beginning of the monitoring, all cow pats were all fresh (2 or 3 days old at the most). They were sampled throughout their decomposition. Overall, 24 pats were repeatedly sampled during summer in 2005 or 2006. In order to evaluate the decay of cow pats, the volume of one fenced pat was estimated by measuring the depth and the surface of the organic material. Considering that cow pats persist about two months, in 2005 it was possible to collect the pats till their disappearance (sampling every two weeks during two months), while in 2006 (sampling every four weeks during five months), sampling ended in July because no pat material was left.

#### I.3.6. Bacterial enumerations

In this study, we chose to evaluate bacterial levels with miniaturized methods, which allowed to treat samples rapidly after collection. Each sample (25 g of soil or cow pat) was blended (Waring-Blender) in 50 ml of phosphate buffer (pH 6.9), which enabled dispersion of bacterial cells and maintenance of sufficient buffer power in the subsequent serial dilutions (done in sterile water).

*E. coli* populations were enumerated using 96-well microplates. Each well, which contained dehydrated 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (i.e. MU/Ec) medium (obtained from 100  $\mu$ l of fresh medium), was inoculated using 200  $\mu$ l of sample dilution (16 wells per dilution), as described (Hernandez *et al.*, 1991). After 36-72 h at 44°C, the plates were read under UV illumination (365 nm). Blue fluorescent wells were scored as positive. To check the specificity of MU/Ec medium to enumerate *E. coli* in soils and cow pats from Bise, 100  $\mu$ l of MU/Ec cultures were collected from each of three wells of the first dilution ( $10^{-2}$ ) and pooled, and 200  $\mu$ l was inoculated in 2 ml of liquid Luria-Bertani medium (Bertani, 1951). After overnight incubation at 37°C, genomic DNA was extracted from the liquid culture with the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerdt, France) and 16S rRNA was amplified with eubacterial primers pA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and pH

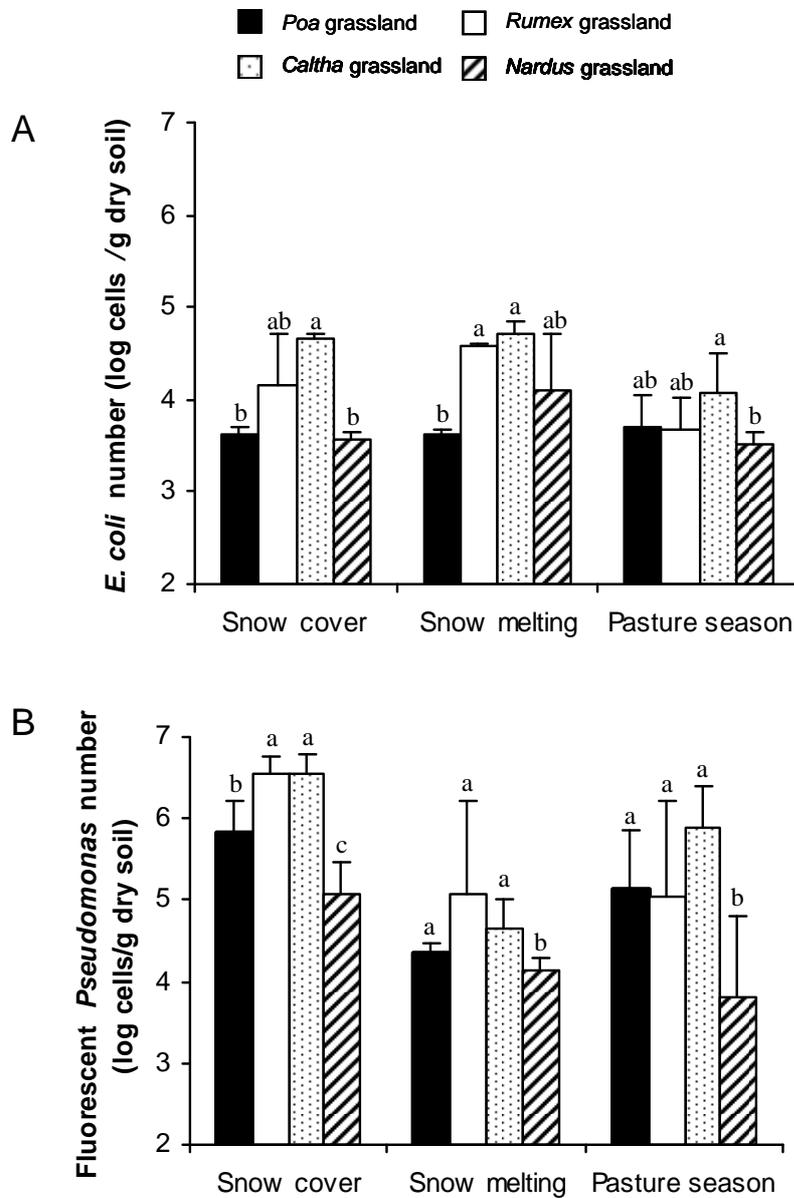


Figure 27 : Numbers of *E. coli* and fluorescent *Pseudomonas* in the topsoil layers (downhill topsoil) under snow cover (January 2006; n = 4), during snow melting (May 2006; n = 4) and during the pasture season (August 2006; n = 8) for each pasture unit studied (synchronic approach). Results are expressed as log cells g<sup>-1</sup> dry matter (means ± standard deviations). The statistical relationship between the four treatments for each sampling (ANOVA and Tukey tests) is indicated by letters a, b and c ( $P < 0.05$ ).

(5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') (Bruce *et al.*, 1992). Denaturation, annealing and extension temperatures were respectively 94 (45 s), 55 (45 s) and 72°C (1 min), as described by Bruce *et al.* (1992). Then, PCR products were cleaned to remove excess primers and primers dimers with the NucleoSpin<sup>®</sup> extractII kit (Macherey-Nagel EURL). Purified PCR products were cloned into pGEMT-easy vector (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions. Plasmid inserts from 13 clones were sequenced by Genoscreen (Lille, France). The sequences were assessed by BLASTN (Altshul *et al.*, 1990).

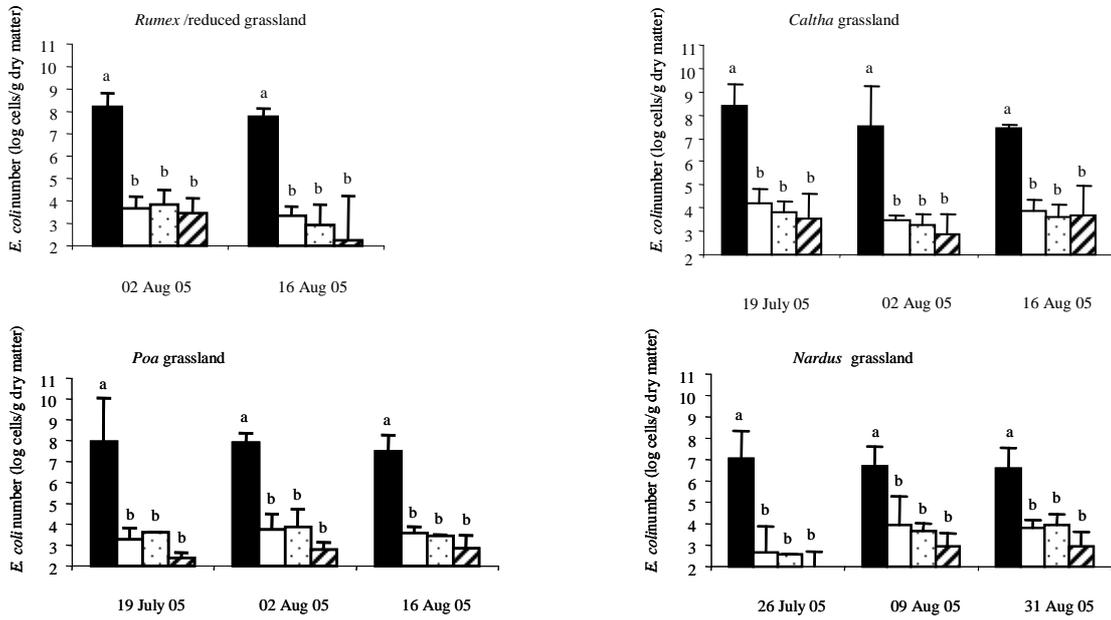
The fluorescent *Pseudomonas* spp. were enumerated in liquid King's B medium (King *et al.*, 1954) supplemented with cycloheximide (15 mg L<sup>-1</sup>), ampicillin (40 mg L<sup>-1</sup>) and chloramphenicol (13 mg L<sup>-1</sup>) (Simon *et al.*, 1974). Fifty µl from each dilution were inoculated in 8 wells of 96-well microplates containing 150 µl of medium each. After incubation at 28°C for 4-5 days, plates were read under UV illumination at 365 nm. Yellow fluorescent wells were scored as positive.

Cell numbers of *E. coli* and fluorescent *Pseudomonas* were determined with a MPN (Most Probable Number) table (McGrady, 1915). The detection threshold was 10<sup>2</sup> cells g<sup>-1</sup> dry matter. About 10 g of fresh soil or cow pat was heated at 105°C overnight to estimate the water content of samples. Bacterial counts were expressed as log cells g<sup>-1</sup> dry matter.

### I.3.7. Phylogenetic relationships between partial *uidA* sequences recovered from cow pat and soil total DNA

Gene *uidA* encodes the β-D-glucuronidase and is used as a marker gene of *E. coli* (Jefferson *et al.*, 1986). 97% of *E. coli* are able to express the β-D-glucuronidase activity (Kilian and Bülow, 1976). 38 partial *uidA* sequences (166 bp) were amplified using primers UAL1935 and UAR2105 as described by Bej *et al.* (1991), and cloned into pGEMT-easy vector as described above. The *uidA* sequences originated from *E. coli* isolates selected on MU/Ec or MU/Ec enrichment cultures. For the enrichment cultures, DNA was extracted with the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel) from cow pats and *Poa* and *Rumex* grassland soils. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2001). The distance-based tree was built using the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) and the Kimura-2-parameter model. Nodal robustness of the tree was assessed using 1000 bootstrap replicates.

A



B

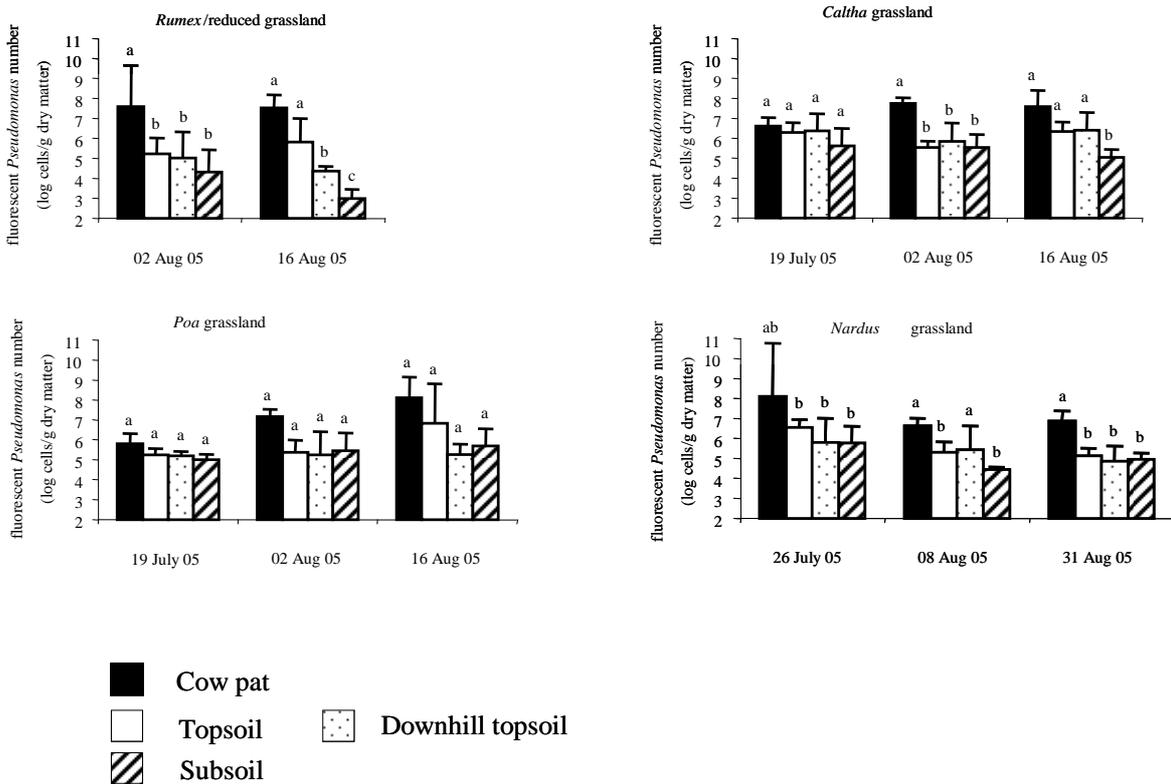


Figure 28 : Numbers of *E. coli* (A) and fluorescent *Pseudomonas* (B) in each pasture unit ( $n = 3$  pat/soil systems per unit) during summer 2005 according to the diachronic sampling. Results are expressed as log cells/g of dry matter (means  $\pm$  standard deviations). For each type of bacterial count, the statistical relationship at each date between the four treatments (ANOVA and Tukey tests) is indicated by letters a, b and c ( $P < 0.05$ ).

### I.3.8. Statistical analyses

Results were expressed as means  $\pm$  standard deviation. Synchronic approach data were assumed to be unlinked considering the large time interval between two sampling dates, and one-way ANOVA were performed. Tukey tests were used to compare means of bacterial numbers found in each pasture unit at each sampling date.

For the diachronic approach, one-way ANOVA were performed to compare means of bacterial numbers obtained from different layers in different sets of samples at each sampling date. Moreover, MANOVA was carried out to assess the effects of soil layer and pasture unit over several sampling dates. Values under the threshold detection were considered as null before computing means and performing statistical analyses. All tests were conducted at  $P < 0.05$ , using JMP5.0.1 (SAS System software, Cary, NC).

## I.4. Results

### I.4.1. Inputs of fecal bacteria and survival within individual cow pats

The *Nardus* and *Caltha* grasslands were little visited by cattle and the area covered by cow pats never exceeded 1 m<sup>2</sup> per 400-m<sup>2</sup> plot (Figure 25). The *Rumex* and *Poa* grasslands were more frequented. On *Poa* grassland, the pat coverage level fluctuated between 0.5 and 1.5 m<sup>2</sup> per plot in July, exceeded 1.5 m<sup>2</sup> at the start of August (Figure 25) and reached up to 3 m<sup>2</sup> per plot in mid August (not shown). In contrast, it ranged between 1.5 and 3.3 m<sup>2</sup> per plot on the *Rumex* grassland, with high values (3 m<sup>2</sup>) already found in June.

*E. coli* was enumerated using MU/Ec media, which was appropriate since the 16S rRNA sequences obtained at Bise showed more than 97% (except in one case, 91%) identity with sequences of established *E. coli* or *Shigella*-annotated *E. coli* (not shown). When the bacterial content of specific cow pats was monitored in time, it appeared that *E. coli* remained at about 10<sup>7</sup> cells/g dry fecal matter throughout the one-month period (Figure 26). Similar levels were found for the fluorescent pseudomonads. Although bacterial concentrations fluctuated little in time, total bacterial stocks strongly decreased due to pat decay. Indeed, the volume of one pat (fenced to facilitate monitoring) decreased from 2.8 to 0.07 liter within 30 days (i.e. 98% loss of initial bacterial stocks).

Table 12. Least square means (LSM) for *E. coli* and for fluorescent *Pseudomonas* in the four pasture units during pasture season 2005. For each type of bacteria, the statistical relations between treatments is indicated using letters a and b (MANOVA;  $P < 0.05$ ). MANOVA did not evidence any difference between the soil layers (not shown), and thus all data were combined in the analysis.

Pasture unit	<i>E. coli</i>	Fluorescent <i>Pseudomonas</i>
<i>Rumex</i> grassland	3.24 b	4.62 b
<i>Poa</i> grassland	3.28 ab	5.48 a
<i>Caltha</i> grassland	3.73 a	5.89 a
<i>Nardus</i> grassland	3.26 a	5.36 b

#### I.4.2. Persistence of culturable *E. coli* in topsoil layers of different pasture units (synchronic assessment)

Synchronic assessment of topsoil layers (0-5 cm), which were sampled between cow pats (i.e. “downhill topsoil” samples) evidenced *E. coli* at significant levels (between  $10^3$  and  $10^5$  cells  $g^{-1}$  dry soil) in all 64 samples (Figure 27). *E. coli* persisted in soil even in the absence of the bovine herd, for example under the snow cover (thickness of 1.6 m in January 2006) and during snow melting (in May 2006). *E. coli* numbers remained constant in the *Poa* grassland, whereas a decrease (between 0.5 and 1 log unit) was observed during the pasture season for the *Nardus*, *Caltha* and *Rumex* grasslands. *E. coli* numbers were significantly lower in the *Poa* and *Nardus* grassland topsoils ( $3 \times 10^3$  to  $10^4$  cells  $g^{-1}$  dry soil) than in the *Rumex* and *Caltha* grassland topsoils ( $5 \times 10^4$  to almost  $10^5$  cells  $g^{-1}$  dry soil). At each sampling date, the highest numbers were found in the *Caltha* grassland (Figure 28), although it displayed the lowest cow pat input (Figure 26). In steep zones that are not grazed by cattle, 7 of the 16 soil samples collected (i.e. 45%) contained *E. coli* populations at the same level of  $10^3$  to  $10^4$  cells  $g^{-1}$  dry soil.

Fluorescent *Pseudomonas* were recovered in all samples from the four pasture units, at levels ranging between  $10^4$  and  $5 \times 10^6$  cells  $g^{-1}$  dry soil (Figure 27). Numbers fluctuated in time, noticeably in the *Poa* and *Caltha* grasslands. The lowest values were observed during snow melting. Overall, the *Caltha*, *Poa* and *Rumex* grasslands displayed higher densities of fluorescent *Pseudomonas* than the *Nardus* grassland.

#### I.4.3. Transfer and persistence of culturable *E. coli* in subsoil layers of different pasture units in two successive years (diachronic assessment)

In summer 2005 (first year of the study, sampling every two weeks), *E. coli* contents in cow pats (about  $10^6$  to  $10^7$  cells  $g^{-1}$  dry matter) were always higher than those found in topsoil or in subsoil, where the maximum value was  $10^4$  cells  $g^{-1}$  dry soil (Figure 28A). Whatever the pasture unit, *E. coli* contents were not significantly different in topsoil (0-5 cm), subsoil (5-25 cm) (both under cow pats) and downhill topsoil layers (without cow pat cover).

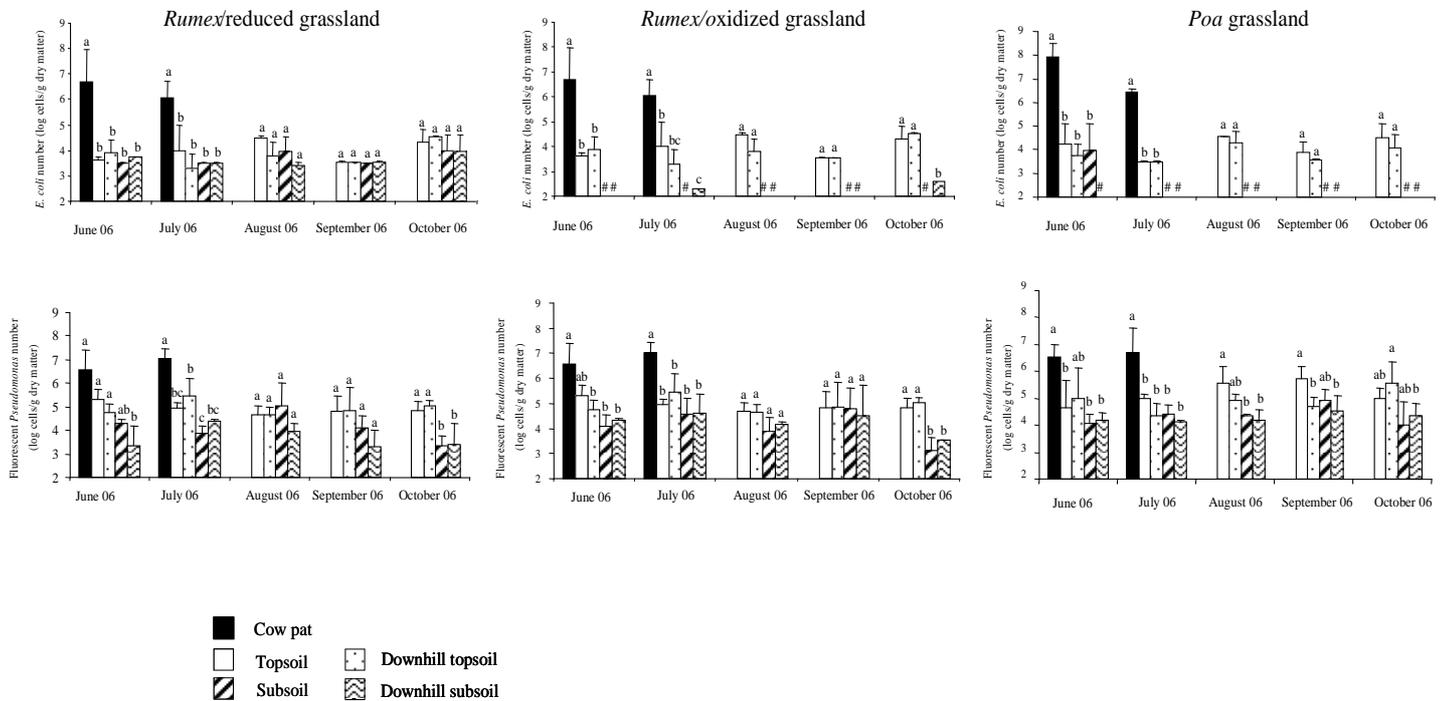


Figure 29 : Numbers of *E. coli* (A) and fluorescent *Pseudomonas* (B) in *Rumex* and *Poa* grasslands during summer 2006 according to the diachronic sampling. In the *Rumex* grassland, data were obtained separately for oxidized-iron (*Rumex/oxidized*) and reduced-iron (*Rumex/reduced*) subsoil layers. Results are expressed as log cells  $g^{-1}$  dry matter (means  $\pm$  standard deviations). # indicates values inferior to the detection limit of  $10^2$  cells  $g^{-1}$  dry matter. For each type of bacterial count, the statistical relationship at each date between the five (when the cow pat was presented) or four (once the pat had disappeared) treatments (ANOVA and Tukey tests) is indicated by letters a, b and c ( $P < 0.05$ ).

MANOVA did not show any significant effect of time ( $P = 0.34$ ), soil layer ( $P = 0.26$ ) or pasture unit ( $P = 0.43$ ) on *E. coli* numbers (Table 12).

In 2005, the number of fluorescent pseudomonads was significantly higher in cow pats (between  $10^6$  and  $10^8$  cells  $\text{g}^{-1}$  dry pat) than in soil (often between  $10^5$  and  $10^6$  cells  $\text{g}^{-1}$  dry soil) in half the cases only (Figure 28B). Their number was not significantly different when comparing the different soil layers of each pasture unit whatever the sampling dates. MANOVA showed a pasture unit effect ( $P = 0.002$ ), the *Poa* and *Caltha* grasslands differing from the *Nardus* and *Rumex/reduced* grasslands (Table 12). Moreover, MANOVA revealed that time had no effect ( $P = 0.34$ ) on the density of pseudomonads. MANOVA was carried out to compare the soil layers and it also showed no significant differences ( $P = 0.056$ ).

In summer 2006 (second year, sampling every four weeks), *E. coli* contents in cow pats were similar to those found in 2005 (Figure 29). As observed during the first year (2005), *E. coli* contents in topsoil samples (i.e. under cow pats or in downhill situations) remained between  $10^3$  and  $10^4$  cells  $\text{g}^{-1}$  dry soil. The same trend was observed in subsoil layers in the case of *Rumex/reduced*. In contrast, *E. coli* numbers in subsoil layer samples were near or under the detection limit in the *Rumex/oxidized* and *Poa* grasslands ( $10^2$  cells  $\text{g}^{-1}$  dry soil), except in subsoil samples under a fresh cow pat (in June) in the *Poa* grassland with around  $10^4$  cells  $\text{g}^{-1}$  dry soil. The difference between *Rumex/oxidized* and *Rumex/reduced* situations was confirmed by analyzing 20 additional samples of downhill subsoil collected during summer 2006 (data not shown). MANOVA carried out using all sampling dates confirmed that (i) *E. coli* numbers were similar in soils under the *Poa* and *Rumex/oxidized* grasslands but different from those in the *Rumex/reduced* grassland ( $P = 0.0002$ ), and (ii) the soil layer effect was highly significant ( $P < 0.0001$ ) (Table 13 and Figure 30A).

The numbers of fluorescent *Pseudomonas* in cow pats and soils were similar in 2006 to those found in 2005 (Figure 29B), with frequently higher values in cow pats than in soil. Numbers were not higher in topsoil layer below cow pats than in downhill topsoil layer, except in August and September in the *Poa* grassland (Figure 29B). They were higher in topsoil layers than in subsoil layers in October in the *Rumex/reduced* and *Rumex/oxidized* grasslands. MANOVA indicated that *Pseudomonas* contents in *Poa* and *Rumex/oxidized* grasslands were similar, but they were slightly greater than those in *Rumex/reduced* grassland ( $P = 0.008$ ). In addition, the soil layer effect was highly significant ( $P < 0.0001$ ) (Table 13 and Figure 30B).

Table 13. Least square means (LSM) for *E. coli* and for fluorescent *Pseudomonas* in the different pasture units (analysis A; 3 treatments) and in the different soils layers (analysis B; 12 treatments) during pasture season 2006. For each type of bacteria, the statistical relations between treatments is indicated using letters a, b, c and d (MANOVA;  $P < 0.05$ ).

	<i>E. coli</i>	Fluorescent <i>Pseudomonas</i>
<u>Comparison of pasture unit (analysis A):</u>		
<i>Rumex</i> /reduced grassland	3.75 a	4.30 b
<i>Rumex</i> /oxidized grassland	2.16 b	4.58 a
<i>Poa</i> grassland	3.37 b	4.68 a
<u>Comparison of different soil layers (analysis B):</u>		
<i>Rumex</i> /reduced topsoil	3.82 a	4.96 ab
downhill topsoil	3.97 a	4.72 b
subsoil	3.67 a	4.12 c
downhill subsoil	3.62 a	3.40 d
<i>Rumex</i> /oxidized topsoil	4.14 a	4.87 ab
downhill topsoil	3.62 a	5.17 ab
subsoil	< 2 c	4.09 c
downhill subsoil	< 2 c	4.23 bc
<i>Poa</i> topsoil	4.12 a	5.19 a
downhill topsoil	3.83 a	4.89 ab
subsoil	2.07 b	4.35 bc
downhill subsoil	< 2 c	4.28 bc

#### I.4.4. Diversity of *E. coli* populations from cow pats and soils

A preliminary assessment of *E. coli* diversity was done based on partial *uidA* sequences (166 bp). PCR products were obtained from cow pats (n = 10) and soils (n = 28) sampled on *Poa* and *Rumex* grasslands. All 38 *uidA* PCR products corresponded to *uidA* sequences of *E. coli*. The phylogenetic tree derived from the analysis of these sequences evidenced two main groups, which were supported by bootstrap values higher than 60% (Figure 31). The first group clustered sequences obtained from all types of samples (cow pats and soils) except from *Rumex* subsoil, as well as all *E. coli* sequences found in GenBank database (i.e. sequences of *E. coli* K-12, *E. coli* O157:H7 strains, several other human pathogens, and water isolates (Farnleitner *et al.*, 2000)). The second group contained only sequences that were amplified from environmental samples in our study, and especially all the sequences obtained from *Rumex* subsoil.

### I.5. Discussion

#### I.5.1. Cow pats, a significant source of fecal *E. coli*

Cows grazing in Bise alpine meadows release large numbers of *E. coli* in their pats (about  $10^7$  cells  $g^{-1}$  dry matter). These numbers are greater than those reported for farm cows (only  $10^5$  to  $10^6$  cells  $g^{-1}$  dry matter; Muirhead *et al.*, 2006a), but diet can affect the number of *E. coli* in feces (Kudva *et al.*, 1997). Several studies have reported survival of *E. coli* in organic farm wastes (Vansteelant, Dorioz and Faivre, unpublished; Kudva *et al.*, 1998) and cow pats (Muirhead *et al.*, 2005). Here, fecal *E. coli* appeared to survive well within cow pats under alpine conditions, substantiating our first hypothesis that cow pat material can serve as a source of fecal *E. coli* for subsequent contamination of plants and soil. However, this source appears to be short-lived since most of the cow pat matter disappears within two months. This duration is relatively short in comparison with previous reports (i.e. 5 to 6 months; Sinton *et al.*, 2007; Gobat, 1998). This difference is probably linked to the occurrence of an active insect and worm community, which appears to be well established in Bise pastures. This animal community contributes significantly to cow pat decay (Lee and Wall, 2006) and the introduction of fecal matter into soil (Oliver *et al.*, 2005a; Gobat *et al.*, 1998; Joergensen *et al.*, 1998; Beven and Germann, 1982). The physical disappearance of cow pats is also due to

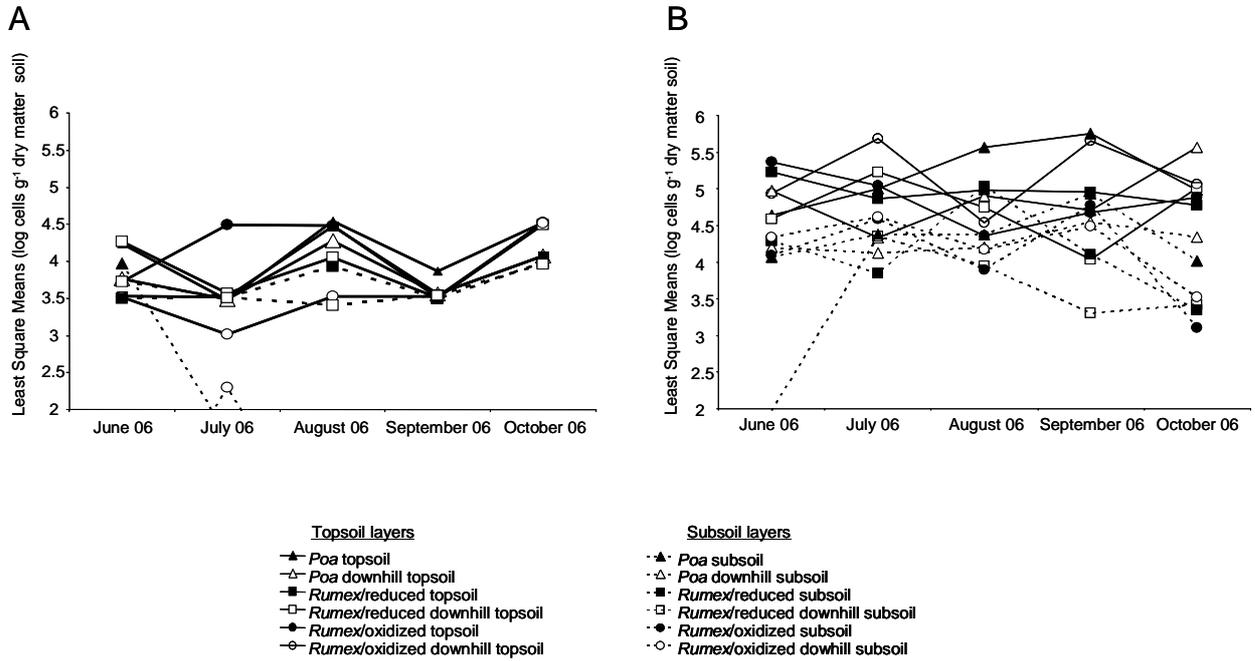


Figure 30 : Least Square Means (LSM) of data from the 2006' diachronic approach obtained by MANOVA for soil contents in *E. coli* (A) and fluorescent *Pseudomonas* (B). Full lanes represent LSM from topsoil data and dotted lines those obtained from subsoil data. Full symbols are used for soil under cow pat and empty symbols for soil downhill from a cow pat. Triangles are used for *Poa*, squares for *Rumex/reduced* and circles for *Rumex/oxidized*.

two other processes, which occur frequently in mountain landscape. Firstly, the splash of fecal matter from pats during rainfall events leads to the spread of fecal bacteria onto the soil surface and vegetation. Secondly, the washing of the cow pats that occurs during rainfall, storm events and snow melting leads to surface runoff and water-assisted infiltration of fecal bacteria into soil (Muirhead *et al.*, 2005; Tyrrel *et al.*, 2003; Thelin and Gifford, 1983).

Wild fauna activity must be taken into account when *E. coli* stocks are considered (e.g. mice dejections contain in the order of  $10^7$  *E. coli* g<sup>-1</sup> dry matter; Dubos *et al.*, 1965). In this work, the *uidA* analysis was only exploratory and could not provide information on *E. coli* sources. However, whilst *E. coli* was always found in the pastures grazed by cattle, this was not the case in areas not frequented by cattle, where fecal contamination from wild fauna was patchy. This suggests that cow pats are the main source of *E. coli* contaminants in Bise pastures.

#### I.5.2. *E. coli* persists in steady numbers in the topsoil of dairy alpine grasslands

Two observations led us to formulate the hypothesis that soil-adapted *E. coli* (sub)populations are present in Bise grasslands, i.e. the steady levels of *E. coli* numbers in the topsoil and the occurrence of a *uidA* cluster containing only sequences retrieved from the watershed, as follows.

First, since (i) cow pats are an important but transient source of culturable fecal *E. coli* and (ii) *E. coli* is considered to be poorly adjusted to soil conditions (Boes *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 2004; Recorbet *et al.*, 1995), it was anticipated that the presence of cow pats would only result in a transient increase of *E. coli* numbers in neighboring surface soil (Oliver *et al.*, 2005b), especially below the cow pat itself. Unexpectedly, culturable *E. coli* were found (i) in all topsoil samples in the four pasture units (even far from cow pats), and (ii) at relatively constant numbers (about  $10^4$  cells g<sup>-1</sup> dry soil) in both years of the study. Steady *E. coli* population levels were observed in topsoil, regardless of (i) whether samples were taken under or between cow pats, (ii) whether or not the pasture unit received large amounts of cow pats, (iii) the soil type and the plant community, and (iv) the time of the year (i.e. under the snow cover, at the end of snow melting or during the pasture season). Therefore, the data refute our second hypothesis (i.e. higher *E. coli* numbers in the soil immediately below cow pats) and third hypothesis (i.e. winter elimination of *E. coli* fecal contaminants). In contrast,

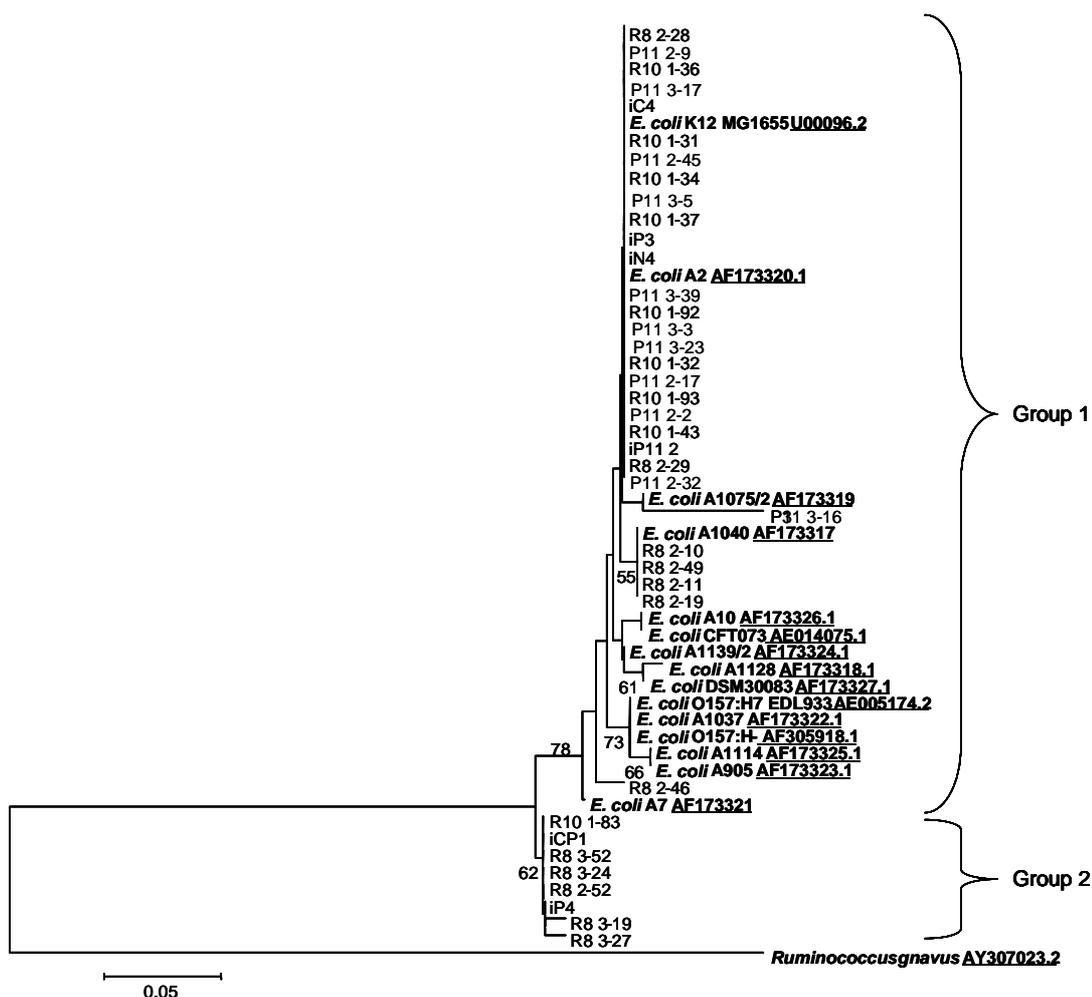


Figure 31 : Phylogenetic analysis of partial *uidA* sequences obtained at the Bise watershed using *E. coli* isolates and PCR clones. Phylogenetic distances were determined by neighbour-joining method and Kimura-2-parameter model analysis. Only nodes with more than 50% bootstrap iterations are represented. Sequences from *uidA* clones were obtained from *Rumex* topsoil (named R8 2-X), *Rumex* subsoil (R8 3-X), a cow pat found in the *Rumex* grassland (R10 1-X), *Poa* topsoil (P11 2-X) and *Poa* subsoil (P11 3-X). Sequences named iP2, iCP1, iP3, iP4, iN4 and iC4 were obtained from isolates of respectively *Poa* topsoil, cow pat, *Poa* subsoil, *Poa* downhill topsoil, *Nardus* downhill topsoil and *Caltha* downhill topsoil. Sequences in bold were obtained in GenBank database from either *E. coli* isolates completely sequenced or *E. coli* water isolates whose *uidA* partial sequences were determined by Farnleitner *et al.* (2000). Underlined bolded sequences are from pathogenic *E. coli*. *uidA* partial sequence of *Ruminococcus gnavus* was used to root the tree. Accession numbers are indicated.

the number of fluorescent *Pseudomonas* in the topsoil was higher but fluctuated more, pointing to a more opportunistic lifestyle.

Second, the occurrence of a cluster containing only *uidA* sequences from the Bise watershed supports the hypothesis of a soil-adapted *E. coli* subpopulation, even though the *uidA* analysis was preliminary (only 38 sequences). Further work will be needed for an in-depth appraisal of the whole diversity of *E. coli* populations and to strengthen the soil adaptation hypothesis. Very few studies have raised the possibility of adaptation/naturalization of *E. coli* to the soil environment (Byappanahalli *et al.*, 2003; 2006). For instance, Byappanahalli *et al.* (2006) showed that certain *E. coli* subpopulations retrieved from soils are distinct from those found in wild fauna dejections, based on horizontal fluorophore-enhanced rep-PCR.

The wide distribution of *E. coli* in topsoil of grazed areas suggests that cumulative inputs of cow pats over the years were instrumental in helping the establishment a soil-naturalized *E. coli* (sub)population in the Bise watershed. The adapted *E. coli* (sub)population displays the attributes of a *K* strategy (Golovlev, 2001), and in our soils the carrying capacity is probably in the order of  $10^4$  cells  $g^{-1}$  dry soil. Perhaps these bacteria are retained in the soil microporosity (Oliver *et al.*, 2005a; Kim and Corapcioglu, 2002), which affords protection against predation by protozoa (Hattori, 1969). However, any growth or large cow pat input of *E. coli* may conduct to colonization of larger pores, which would expose the cells to predation (Vargas and Hattori, 1986) and leaching through water movements (Artz *et al.*, 2005; Vansteelant, Dorioz and Faivre, unpublished; Kim and Corapcioglu, 2002; Abu-Ashour *et al.*, 2000).

Our study dealt with generic *E. coli*, without considering whether pathogenic strains were present. This issue deserves future attention, as for instance *E. coli* O157:H7 has been reported to persist in soil for one (Franz *et al.*, 2005) to several months (Williams *et al.*, 2007) under laboratory conditions.

#### I.5.3. Potential transfer and subsequent persistence of *E. coli* in deeper soil layer vary according to soil conditions

In contrast to topsoil layers, the numbers of *E. coli* (but not of the fluorescent *Pseudomonas*) showed significant variability in subsoil layers. To reach the subsoil layer, fecal bacteria can be disseminated through rain washing of pat and/or transfer of pat pieces by



insects and worms (Williams *et al.*, 2006; Artz *et al.* 2005; Gobat *et al.*, 1998; Joergensen *et al.*, 1998). This is likely to be strongly influenced by water dynamics in the soil. In our study, three types of subsoil situations with different water flux patterns were encountered during the pasture season 2006.

In the first situation (*Poa*), the subsoil was well drained with low or undetectable *E. coli* numbers, especially after cow pats had disappeared. The subsoil under *Poa* grassland is slightly alkaline, which does not correspond to hostile conditions for bacteria. The limited persistence of *E. coli* in this subsoil layer might be due to low nutrient concentration and efficient bacterial transfer to even deeper soil layers (Oliver *et al.*, 2005b).

In the second situation (*Rumex/reduced*), soil drainage and aeration were poor with high and constant *E. coli* numbers. *Rumex/reduced* subsoil properties conducive to *E. coli* survival include non-limiting water availability (as soil is often water saturated), a high organic carbon content (i.e. 43 g kg<sup>-1</sup>) and a high clay content (i.e. 59%). The latter favors adsorption and protection of bacteria in soil (England *et al.*, 2003; Recorbet *et al.*, 1995).

In the third situation (*Rumex/oxidized*), the subsoil is disconnected from the surface water flow, limiting arrival of *E. coli* from the topsoil. In addition, this subsoil displayed low pH (i.e. 4.8) and high Al<sup>3+</sup> content (i.e. 1.46 cmol kg<sup>-1</sup>), which are not favorable to *E. coli* survival (Guida *et al.*, 1991). Indeed, *E. coli* was undetectable in most of the soil samples. In conclusion, *E. coli* survival differed according to subsoil conditions whereas the fluorescent *Pseudomonas* responded little to these different conditions.

#### I.5.4. The soil as an *E. coli* reservoir: conclusion and implications

In this work, it appears that the topsoil of alpine pastures can constitute a major environmental reservoir of *E. coli*, as found for other enterobacteria and human pathogens in planted soil (Egamberdieva *et al.*, 2008; Berg *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2003; Balandreau *et al.*, 2001). These results lead us to refute (i) the principle of *E. coli* being a transient survivor in other environments than the intestinal tract, as well as (ii) the use of this bacterium as a robust indicator of fecal contamination. Indeed, it is likely that fecal *E. coli* have formed a naturalized *E. coli* (sub)population, which is now a part of the indigenous topsoil community of various dairy alpine grasslands. Our results suggest the occurrence of two *E. coli* genotypic groups, one corresponding to feces strains and the other to *E. coli* that are adapted to the topsoil environment and not leached toward the river.



The occurrence of different *E. coli* (sub)populations will have to be taken into account when building models of surface water contamination. For surface runoff transfer, modeling developments consider the relations between cow pat presence and areas of water excess at the soil surface. Concerning the transient stocks of *E. coli* in certain subsoil layers, the water transfer process in porous environment has to be integrated. According to Muirhead *et al.* (2006b, 2006c), in overland flow experiments, *E. coli* are predominantly transported from fecal material in small free particles. Thus, in non-erosive overland flow conditions (as in *Rumex* grassland), if *E. coli* populations are adapted and settled in soil, they should neither be resuspended by surface run-off nor be implicated in stream contamination. In this case, the indicator value of *E. coli* populations should not be affected by the occurrence of naturalized populations. If erosive runoff (as in *Poa* grassland) is involved in the transport of soil particles or sediments, the indicator value should integrate the occurrence of these adapted populations.

#### I.6. Acknowledgments

We thank P. Quetin, J.-P. Bosse, N. Bois, S. Aubier and L. Gruffat for their technical help during the different assessments. This work was funded by a GESSOL project (“Pastor”) from the Ministère de l’Ecologie et du Développement Durable (France). S. Texier was supported by a grant from the Institut National de la Recherche Agronomique and from the Assemblée des Pays de Savoie.

#### I.7. References

- Abu-Ashour J., and H. Lee. 2000. Transport of bacteria on sloping soil surfaces by runoff. *Environ. Tox.* 15:149-153.
- Altshul S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.
- Artz R.R.E., J. Townend, K. Brown, W. Towers, and K. Killham. 2005. Soil macropores and compaction control the leaching potential of *Escherichia coli* O157:H7. *Environ. Geol.* 7:241-248.
- Avery S.M., A. Moore, and M.L. Hutchison. 2004. Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:355-359.



Balandreau J., V. Viillard, B. Cournoyer, T. Coenye, S. Laevens, and P. Vandamme. 2001. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:982-985.

Barrio G., B. Alvera, J. Puigdefabregas, and C. Diez. 1997. Response of high mountain landscape to topographic variables: Central Pyrenees. *Landscape Ecol.* 12:95-115.

Bej A.K., S.C. McCarty, and R.M. Atlas. 1991. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2429-2432.

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

Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62:293-300.

Beven K., and P. Germann. 1982. Macropores and water flow in soils. *Water Resour. Res.* 18:1311-1325.

Boes J., L. Alban, J. Bagger, V. Mogelmose, D.L. Baggesen, and J.E. Olsen. 2005. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in slurry applied to clay soil on a Danish swine farm. *Preventive Vet. Med.* 69:213-228.

Bruce K.D., W.D. Hiorns, J.L. Hobman, A.M. Osborn, P. Strike, and D.A. Ritchie. 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3413-3416.

Byappanahalli M.N., M. Fowler, D. Shively, and R. Whitman. 2003. Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a midwestern coastal stream. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4549-4555.

Byappanahalli M.N., R. L. Whitman, D.A. Shively, M. J. Sadowsky, and S. Ishii. 2006. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environ. Microbiol.* 8:504-513.

Cassell E., R. Kort, D. Meals, S. Aschmann, J. Dorioz, and D. Anderson. 2001. Dynamic phosphorus mass balance modeling of large watersheds: long-term implications of management strategies. *Water Sci. Technol.* 43:153-162.

Celico F., I. Musilli, and G. Naclerio. 2004. The impacts of pasture- and manure-spreading on microbial groundwater quality in carbonate aquifers. *Environ. Geol.* 46:233-236.

Chandler D.S., I. Farran, and J.A. Craven. 1981. Persistence and distribution of pollution indicator bacteria on land used for disposal of piggery effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:453-460.



- Crane S.R., J.A. Moore, M.E. Grismer, and J.R. Miner. 1983. Bacterial pollution from agricultural sources: A review. *Trans. A.S.A.E.* 26:858-866.
- Cronin D., Y. Moënné-Loccoz, A. Fenton, C. Dunne, D.N. Dowling, and F. O'Gara. 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23:95-106.
- Dong Y., A.L. Iniguez, B.M.M. Ahmer, and E.W. Triplett. 2003. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1783-1790.
- Dorioz J.M., and J.P. Party. 1987. Dynamique écologique et typologie de territoires pastoraux des Alpes du Nord. *Acta Oecol.* 8:257-280.
- Dubos R., W. R. Schaedler, R. Costello, P. Hoet. 1965. Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 122:67.
- Egamberdieva D., F. Kamilova, S. Validov, L. Gafurova, Z. Kucharova, and B. Lugtenberg. 2008. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environ. Microbiol.* 10:1-9.
- England L.S., H. Lee, and J.T. Trevors. 2003. Bacterial survival in soil: effect of clays and protozoa. *Soil Biol. Biochem.* 25:525-531.
- Entry J.A., and N. Farmer. 2001. Movement of coliform bacteria and nutrients in ground water flowing through basalt and sand aquifers. *J. Environ. Qual.* 30:1533-1539.
- Estrada I.B., A. Aller, F. Aller, X. Gómez, and A. Morán. 2004. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 93:191-198.
- Farnleitner A.H., N. Kreuzinger, G.G. Kavka, S. Grillenberger, J. Rath, and R.L. Mach. 2000. Simultaneous detection and differentiation of *Escherichia coli* populations from environmental freshwaters by means of sequence variation in a fragment of the  $\beta$ -D-glucuronidase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1340-1346.
- Faust M.A. 1982. Relationship between land-use practices and fecal bacteria in soils. *J. Environ. Qual.* 11:141-146.
- Fisher D.S., J.L. Steiner, D.M. Endale, J.A. Stuedemann, H.H. Schomberg, A.J. Franzluebbers, and S.R. Wilkinson. 2000. The relationship of land use practices to surface water quality in the Upper Oconee Watershed of Georgia. *Forest Ecol. Manage.* 128:39-48.
- Franz E., A.D. van Diepeningen, O.J. de Vos, and A.H.C. van Bruggen. 2005. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and



*Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in manure, manure-amended soil, and Lettuce. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6165-6174.

Gagliardi J.V., and J.S. Karns. 2000. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:877-883.

George I., A. Anzil, and P. Servais. 2004. Quantification of fecal coliform inputs to aquatic systems through soil leaching. *Water Res.* 38:611-618.

Gobat J., M. Aragno, and W. Matthey. 1998. Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH-1015 Lausanne.

Golovlev E.L. 2001. Ecological strategy of bacteria: specific nature of the problem. *Microbiology* 70:379-383.

Gordon D.M. 2001. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiology* 147:1079-1085.

Guida L., Z. Saidi, M.N. Hughes, and R.K. Poole. 1991. Aluminum toxicity and binding to *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 156:507-512.

Hattori T. 1969. Fractionation of microbial cells in soil aggregates. *Soil Biol.* 11:30-31.

Hernandez J.F., J.M. Guibert, J.M. Delattre, C. Oger, C. Charrière, B. Hugues, R. Serceau, and F. Sinegre. 1991. Evaluation of miniaturized procedure for enumeration of *Escherichia coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4-methylumbelliferyl -D-glucuronide. *Water Res.* 25:1073-1078.

Jamieson R.C., R.J. Gordon, K.E. Sharples, G.W. Stratton, and A. Madani. 2002. Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water: a review. *Canadian Biosyst. Eng.* 44:1.1-1.9.

Jefferson R.A., S.M. Burgess, and D. Hirsh. 1986.  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8447-8451.

Joergensen R.G., H. Kuntzel, S. Scheu, and D. Seitz. 1998. Movement of faecal indicator organisms in earthworm channels under a loamy arable and grassland soil. *Appl. Soil Ecol.* 8:1-10.

Keel C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, and U. Burger. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:4-13.

Kilian M., and P. Bülow. 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.* 8:245-251.



Kim S.B., and M.Y. Corapcioglu. 2002. Contaminant transport in dual-porosity media with dissolved organic matter and bacteria present as mobile colloids. *J. Contam. Hydrol.* 59:267-289.

King E., M. Ward, and D. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.

Kudva I.T., K. Blanch, and C.J. Hovde. 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3166-3174.

Kudva I.T., C.W. Hunt, C.J. Williams, U.M. Nance, and C.J. Hovde. 1997 Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. *Appl Environ Microbiol.* 63:3878-3886.

Kumar S., K. Tamura, I.B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 17:1244-1245.

McGrady M.H. 1915. The numerical interpretation of fermentation tube results. *J. Infect. Dis.* 17:183-212.

Lee C.M. and R. Wall. 2006. Cow-dung colonization and decomposition following insect exclusion. *Bull. Entomol. Res.* 96:315-322.

Muirhead R.W., R.P. Collins, and P.J. Bremer. 2005. Erosion and subsequent transport state of *Escherichia coli* from cowpats. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2875-2879.

Muirhead R.W., R.P. Collins, and P.J. Bremer. 2006a. Numbers and transported state of *Escherichia coli* in runoff direct from fresh cowpats under simulated rainfall. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:83-87.

Muirhead R.W., R.P. Collins, and P.J. Bremer. 2006b. Interaction of *Escherichia coli* and Soil Particles in Runoff. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3406-3411.

Muirhead R.W., R.P. Collins, and P.J. Bremer. 2006c. The association of *E. coli* and soil particles in overland flow. *Water Sci. Technol.* 54:153-159.

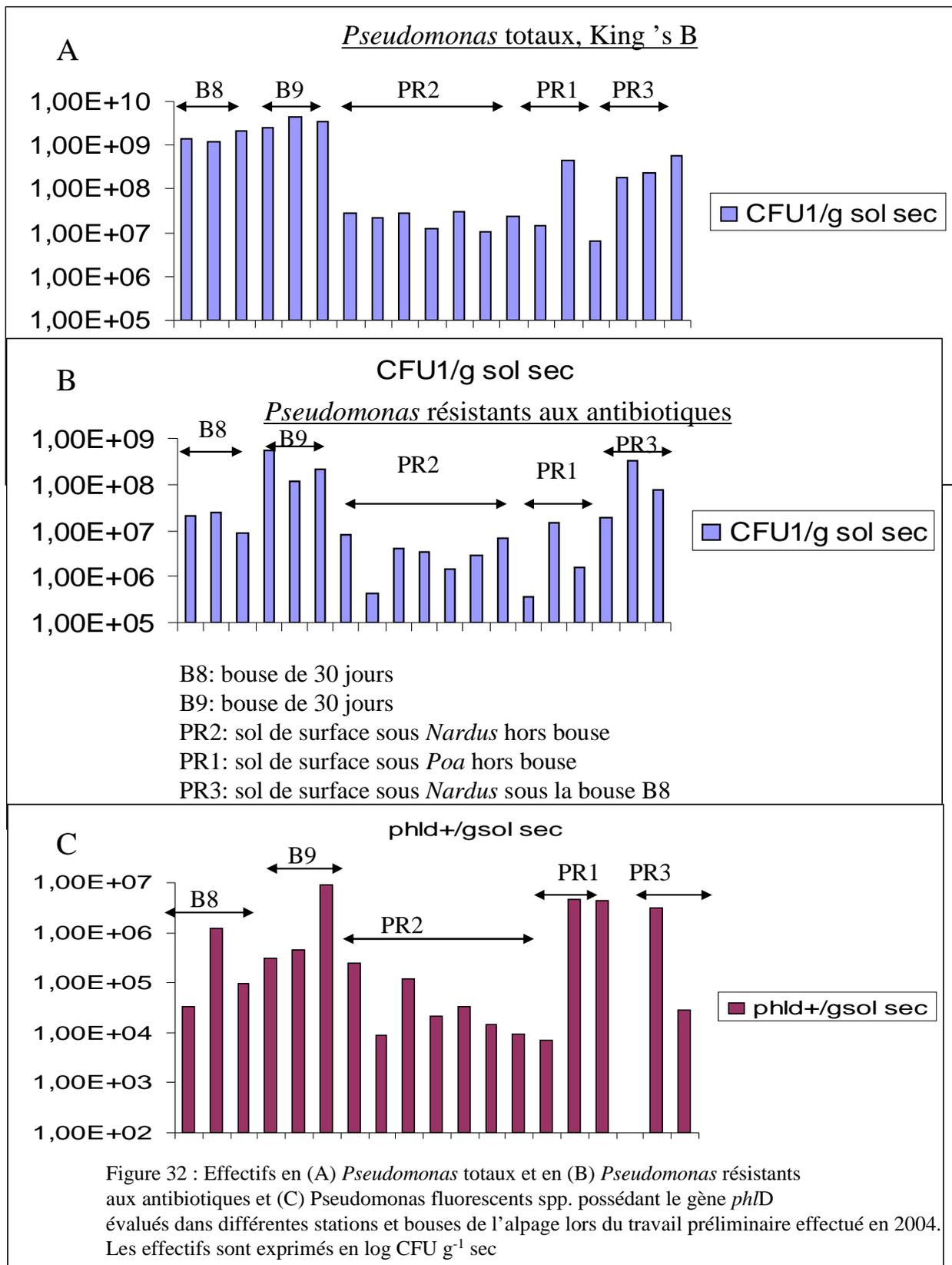
Ogden I.D., N.F. Hepburn, M. MacRae, N.J.C. Strachan, D.R. Fenlon, S.M. Rusbridge, and T.H. Pennington. 2002. Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Lett. Appl. Microbiol.* 34:100-104.

Oliver D.M., C.D. Clegg, P.M. Haygarth, and A.L. Heathwaite. 2005. Assessing the potential for pathogen transfer from grassland soils to surface waters. *Adv. Agron.* 85:125-180.

Oliver D.M., L. Heathwaite, P.M. Haygarth, and C.D. Clegg. 2005. Transfer of *Escherichia coli* to water from drained and undrained grassland after grazing. *J. Environ. Qual.* 34:918-925.



- Recorbet G., A. Richaume, and L. Jocteur-Monrozier. 1995. Distribution of a genetically-engineered *Escherichia coli* population introduced into soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:38-40.
- Saitou N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Simon A., and E.H. Ridge. 1974. The use of ampicillin in a simplified selective medium for the isolation of fluorescent pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* 37:459-460.
- Sinton L.W., R.R. Braithwaite, C.H. Hall, and M.L. Mackenzie. 2007. Survival of indicator and pathogenic bacteria in bovine feces on pasture. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7917-7925.
- Soil Survey Staff. 2006. Keys to Soil Taxonomy. Tenth Edition, United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service. 341 p.
- Thelin R., and G. Gifford. 1983. Fecal coliform release patterns from fecal material of cattle. *J. Environ. Qual.* 12:57-63.
- Trevisan D., J.Y. Vansteelant, and J.M. Dorioz. 2002. Survival and leaching of fecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. *Water Res.* 36:275-283.
- Troxler, J., M. Zala, A. Natsch, Y. Moënne-Loccoz, and G. Défago. 1997. Autecology of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the rhizosphere and inside roots at later stages of plant development. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23:119-130.
- Tyrrel S.F., and J.N. Quinton. 2003. Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. *J. Appl. Microbiol.* 94:87-93.
- Vargas R., and T. Hattori. 1986. Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. *FEMS Microbiol. Lett.* 38:233-242.
- Weiser R.S., and C.M. Osterud. 1945. Studies on the death of bacteria at low temperatures: I. the influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period of exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 50:413-439.
- Williams A.P., L.M. Avery, K. Killham, and D.L. Jones. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the rhizosphere of maize grown in waste-amended soil. *J. Appl. Microbiol.* 102:319-326.
- Williams A.P., P. Roberts, L.M. Avery, K. Killham, and D.L. Jones. 2006. Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58:54-64.



## II. Survie des *Pseudomonas* fluorescents dans les bouses et les différents sols du bassin versant.

Afin de resserrer les objectifs de l'article précédent sur le comportement environnemental des *E. coli* d'origine bovine, l'évolution des populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents n'a pas été approfondie. Ce chapitre a pour but de combler cette lacune et de discuter les résultats obtenus sur ces populations telluriques et adaptées à la rhizosphère des graminées.

### II.1. Travail préalable sur l'alpage réalisé en 2004

Un travail préalable visant à déterminer si des *Pseudomonas* fluorescents étaient présents dans quelques sols de l'alpage a été effectué par Claire Prigent-Combaret et Marie-Andrée Poirier (Equipe Rhizosphère, Ecologie microbienne). Des MPN-PCR ciblant le gène *phlD*, impliqué dans la voie de biosynthèse d'un antibiotique, le DAPG, ont été réalisées après 72h de croissance des bactéries à 28°C sur le milieu King's B<sup>+++</sup> c'est-à-dire le milieu King's B (King *et al.*, 1954) supplémenté par 3 antibiotiques, la cycloheximide (15 µg ml<sup>-1</sup>), le chloramphénicol (13 µg ml<sup>-1</sup>) et l'ampicilline (40 µg ml<sup>-1</sup>), comme décrit par Simon *et al.* (1974). Ce milieu sélectionne les *Pseudomonas* fluorescents et favorise la croissance des *Pseudomonas* PhlD<sup>+</sup>.

Différents échantillons de bouses et de sols sous-jacents sous *Nardus* et sous *Poa* ont été collectés. Des *Pseudomonas* fluorescents PhlD<sup>+</sup> ont été trouvés dans tous les échantillons à des valeurs en majeure partie comprises entre 10<sup>6</sup>/10<sup>7</sup> cellules g<sup>-1</sup> de matière sèche dans les bouses et entre 10<sup>5</sup> et 10<sup>7</sup> cellules g<sup>-1</sup> sol sec dans les sols sous *Nardus* et *Poa*.

La Figure 32 synthétise les résultats obtenus lors de cette étude préalable, i.e. sur les effectifs en *Pseudomonas* totaux (A), *Pseudomonas* spp. fluorescents (B) et enfin, *Pseudomonas* spp. fluorescents PhlD<sup>+</sup> (C).

### II.2. Des stocks surprenants dans les bouses

L'étude des *Pseudomonas* fluorescents dans les bouses et dans des prélèvements rectaux effectués à deux reprises par un vétérinaire sur un lot de vaches laitières représentatif a révélé des concentrations bactériennes assez importantes. Des niveaux équivalents à ceux trouvés



dans les sols ont été observés (soit  $10^6$  à  $10^7$  g<sup>-1</sup> bouse sèche). A notre connaissance, aucune de données équivalentes sur les teneurs en *Pseudomonas* spp. fluorescents dans les déjections bovines n'est disponible dans la littérature. Il est possible que les *Pseudomonas* fluorescents proviennent des particules de sols ingérées en même temps que la végétation lors du pâturage des animaux. Ceux-ci pourraient survivre dans le système digestif de la vache et seraient ensuite excrétés. Le pH du rumen étant compris entre 6 et 7, cette hypothèse n'est pas invraisemblable. De plus, les nutriments n'étant pas limitants dans le rumen, ils pourraient être un atout pour la survie des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Une autre explication concerne l'abreuvement des troupeaux à la rivière, dans laquelle de fortes concentrations en *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été relevées (autour de  $10^4$  CFU 100 ml<sup>-1</sup> d'eau durant tout le mois d'Août 2006). Les insectes colonisant les bouses pourraient aussi être des vecteurs en *Pseudomonas* spp. fluorescents. Cependant, aucune de ces explications n'a été vérifiée et ce sujet mériterait un approfondissement.

### II.3. Evolution des stocks dans les différentes rhizosphères au cours de l'année 2006

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été trouvés dans tous les échantillons collectés dans les 4 stations. Les plus fortes valeurs ont été notées dans les stations *Caltha*, *Poa* et *Rumex* (entre  $6 \cdot 10^5$  et  $4 \cdot 10^6$  cellules/g sol sec). La station acide *Nardus* présentait les effectifs les plus faibles (entre  $2 \cdot 10^4$  et  $10^5$  cellules/g sol sec) ce qui n'est guère surprenant car le pH de ce sol (pH=4,8) correspond à un pH qui limite le développement des *Pseudomonas*. Durant la fonte des neiges en mai, les concentrations chutent brutalement dans les stations *Poa* et *Caltha* pour rejoindre des niveaux semblables à ceux d'*E. coli* (soit  $10^4$  cellules g<sup>-1</sup> sol sec) alors que les effectifs demeurent stables dans les stations *Rumex* et *Nardus*.

Les populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont connues comme capables de coloniser de façon efficace la surface racinaire des graminées (Bersgma-Vlami *et al.*, 2005) dont sont majoritairement constituées les prairies alpines (Meyer *et al.*, 2004). Il n'est donc pas surprenant de trouver des *Pseudomonas* spp. fluorescents dans l'ensemble des échantillons collectés. Ces bactéries telluriques sont capables de perdurer dans la rhizosphère même sous le manteau neigeux lorsque la litière végétale est en décomposition (Lipson *et al.*, 1999). Par contre, lors de la fonte des neiges, une chute importante des effectifs est notée dans les deux stations les plus filtrantes alors que ce phénomène n'a pas été observé dans les situations où les flux d'eau sont limités. Durant la période de fonte des neiges, on sait que la



rhizodéposition est faible (Lipson et Schmidt, 2004), ce qui induit probablement une perte d'adhérence des *Pseudomonas* sur les racines, ceux-ci pouvant alors être facilement entraînés par les flux d'eau très intenses durant cette période de fonte du manteau neigeux. Le reliquat de *Pseudomonas* serait alors localisé dans la microporosité du sol et non soumis aux flux d'eau, avec un comportement équivalent à celui d'*E. coli* dans l'horizon de surface.

II.4. Evolution des stocks dans les différents compartiments des stations au cours de la saison de pâturage.

Durant les étés 2005 et 2006, les concentrations de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été évaluées dans les différentes stations de l'alpage et à différentes profondeurs de sol. La 1<sup>ère</sup> année de suivi, le pas de temps entre les prélèvements était de 2 semaines. Comme pour *E. coli*, peu de différence entre les différents types d'échantillons a été notée en 2005. Que ce soit dans les bouses, dans les différents types de sol et dans les différents horizons de sol, les concentrations relevées sont relativement similaires (aux environs de  $10^6$  cellules  $g^{-1}$  sec), excepté dans la station *Rumex* où un niveau plus élevé a été détecté dans le sol rhizosphérique immédiatement sous la bouse et à la fin de l'échantillonnage. Les analyses MANOVA ont mis en évidence les plus fortes concentrations dans les stations *Poa* et *Caltha* tout au long de la saison ( $P=0.0017$ ). Aucun effet « temps » ni d'effet « horizons de sol » n'a été détecté (respectivement  $P=0.34$  et  $P=0.056$ ). Les tests MANOVA ont toutefois confirmé une plus forte concentration en *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la station *Rumex* dans le sol rhizosphérique sous la bouse ( $P=0.011$ ) par rapport aux autres situations sous *Rumex*.

Comme aucune différence entre les horizons et dans le temps n'a été détectée la 1<sup>ère</sup> année, le pas de temps entre les prélèvements a été allongé la 2<sup>ème</sup> année d'échantillonnage. Un délai de 4 semaines entre chaque échantillonnage au lieu de 2 a été respecté, les échantillons ayant été collectés durant 4 mois, avec au total 2 prélèvements réalisés lorsque les bouses sont présentes en surface et 3 prélèvements une fois la bouse disparue de la surface. Seules les stations les plus pâturées (*Poa* et *Rumex*) ont été conservées durant ce 2<sup>nd</sup> suivi. D'une façon générale, les concentrations en *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le sol rhizosphérique ne sont pas affectées par la présence ou l'absence de la bouse. L'apport par la bouse de matière organique exogène n'influence donc pas les niveaux de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans le sol. Ces résultats sont équivalents à ceux de Liu *et al.* (2007), obtenus dans le cadre d'amendement par compost. Le sol rhizosphérique présente des effectifs plus importants que les horizons plus profonds, notamment à la fin de l'échantillonnage (environ  $10^5$  vs  $5.10^3$



cellules/g sec). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents étant principalement associées au système racinaire des plantes, la densité racinaire de l'horizon profond (environ 20 cm), relativement plus faible que celle présente en surface, explique les plus faibles teneurs en profondeur de ces populations bactériennes rhizosphériques en profondeur.

### III. Interactions *E. coli* vs. *Pseudomonas* spp. fluorescents dans les sols de l'alpage ?

Les différents résultats obtenus lors de l'évaluation des effectifs d'*E. coli* et de *Pseudomonas* spp. fluorescents dans les sols en surface (0-5 cm) de l'alpage suggèrent deux localisations différentes de ces espèces dans la porosité du sol. Les *E. coli* dénombrés seraient localisés dans la microporosité des sols, demeurant ainsi protégés de la prédation et de la mobilisation par les flux d'eau. Les effectifs restaient stables et une partie des *E. coli* cultivables trouvés dans le sol seraient naturalisés. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents, quant à eux, sont principalement associés aux racines (Troxler *et al.*, 1997) avec une très faible proportion dans la porosité fine du sol ( $10^4$  vs.  $10^6$  soit environ 1%). Dans la mesure où ces populations occupent 2 niches écologiques différentes, leurs interactions sont peu probables, d'autant plus qu'aucune corrélation n'a été observée entre les variations des effectifs en *E. coli* et des effectifs en *Pseudomonas* spp. fluorescents. Une de nos hypothèses de départ consistait à penser que les populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents, résidentes, étaient susceptibles de réguler les populations d'*E. coli*, notamment via l'excrétion du DAPG, un antibiotique connu pour son effet inhibiteur vis-à-vis d'entérobactéries (Cronin *et al.*, 1997). L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie infirme cette hypothèse.



**Chapitre 3 :**  
**Capacités d'adaptation d'*E. coli* au sol**



### Avant-propos du chapitre 3

Suite aux résultats obtenus chapitre 2, la rhizosphère s'est révélée être un réservoir environnemental permanent en *E. coli* et, du fait de la stabilité des effectifs observés en surface, quelque soit la pression de pâturage et la saison, une hypothèse d'adaptation de certaines populations d'*E. coli* a été émise. Ces populations pourraient avoir acquis ce potentiel d'adaptation grâce à leur transit dans le tractus gastrointestinal des bovins.

Ce chapitre a deux buts. Le 1<sup>er</sup> est d'évaluer l'impact de l'origine environnementale des souches d'*E. coli* sur leur capacité d'adaptation au sol. Le 2<sup>nd</sup> est de mettre au point des outils moléculaires pour évaluer l'état physiologique de bactéries dites contaminantes (*E. coli*) et des bactéries résidentes et adaptées (*Pseudomonas* spp. fluorescents).

Ce chapitre s'organise en deux principales parties. Afin d'évaluer les capacités d'adaptation d'*E. coli* en fonction de son origine environnementale, des cinétiques de survie (évaluation des effectifs) de souches d'origine environnementale différente ont été réalisées en milieu de culture et en microcosmes de sol. Pour développer les outils moléculaires de suivi de l'état physiologique des bactéries, une étude phylogénétique a été réalisée sur différents gènes marqueurs (*fis*, *ftsZ* et *rpoZ* comme marqueurs de la phase exponentielle de croissance et *dps*, *rmf* et *rpoS* comme marqueurs de la phase stationnaire de croissance) et, des amorces spécifiques ont été dessinées. Après avoir vérifié la spécificité de ces amorces, des extractions d'ARN, des rétro-transcriptions et des amplifications des marqueurs ont été réalisées à partir d'échantillons de sols des microcosmes utilisés pour les cinétiques de survie. La mise au point des marqueurs moléculaires est moins avancée pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents que pour *E. coli*. Ainsi, pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents, seuls les résultats concernant la phylogénie et le test de la spécificité des amorces sont présentés.

Nous avons montré que le passage dans le tractus digestif des bovins des souches d'*E. coli* augmente ses propriétés de survie dans le sol par rapport à des souches de laboratoire. La résidence dans un sol confère également aux souches des aptitudes supplémentaires favorisant leur survie dans les sols.

Concernant les marqueurs moléculaires, *rpoZ*, *rmf* et *dps* se sont révélés être des candidats intéressants. Cependant, de nouvelles pistes techniques sont à explorer afin d'améliorer leur détection et de valider la méthodologie en vue de leur utilisation : extraire les ARN du sol à partir de 1,5 g de sol au lieu de 500 mg ou réaliser des rétrotranscriptions spécifiques à chaque gène marqueur et non aléatoires.



## Capacités d'adaptation d'*E. coli* au sol

### **I. Introduction**

On admet qu'une fraction limitée des bactéries fécales est susceptible d'être transférée depuis les bouses vers la profondeur des sols non fissurés. Ainsi, d'après Crane *et al.* (1983), seulement 2% des populations bactériennes déposées à la surface du sol dans les matières fécales sont susceptibles d'être entraînés dans le sol. Ce transfert du milieu « bouse » au milieu « sol » occasionne un stress pour les bactéries fécales puisqu'elles passent d'un milieu riche en nutriments, correspondant à leur habitat primaire, à un milieu oligotrophe. En réponse à ce stress, les bactéries fécales peuvent mettre en place différentes stratégies de survie (voir le chapitre III de la synthèse bibliographique). Ces stratégies écologiques, nommées stratégies r ou K, ne sont pas limitées aux bactéries puisqu'elles régissent également les végétaux et les animaux (Prosser *et al.*, 2007). Les bactéries de stratégie r correspondent à une forte aptitude à répondre aux apports nutritifs exogènes, un fort taux de réplication, un fort taux de mortalité et donc des effectifs très variables (Golovlev, 2001). Les bactéries de type K ont des stratégies radicalement différentes, qui sont adoptées lorsque les conditions de vie sont possibles et se traduisent par des taux de survie élevés. Ces bactéries autochtones, telles que les *Pseudomonas* fluorescents dans la rhizosphère des graminées (Chiarini *et al.*, 1993), ont une forte capacité d'assimilation de substrats présents à de faible concentration mais de façon permanente (exsudats racinaires) et sont également caractérisées par des effectifs stables proches de la capacité biotique du milieu, *i.e.* de la capacité du milieu à héberger des bactéries (Golovlev, 2001). *E. coli* développe une stratégie de type r, car cette espèce est capable de s'adapter à de nouveaux environnements, tels que le sol, pour former des populations acclimatées ou, éventuellement à plus long terme, naturalisées. Cette adaptation peut résulter de l'expression de nouveaux gènes acquis par transferts horizontaux (tels que par conjugaison, transduction, ou transfert des plasmides). Henschke & Schmidt (1990) ont d'ailleurs montré que des transferts de plasmide pouvaient exister entre des *E. coli* introduits dans un sol et la microflore indigène de ce sol. *E. coli* peut aussi tout simplement s'adapter à son nouvel environnement par l'expression d'un potentiel génétique déjà présent sur son génome mais non exprimé jusque-là (gènes cryptiques). Cette adaptation permet ainsi d'accéder à de nouvelles ressources nutritives.



Le passage d'une espèce bactérienne dans l'environnement ou dans des habitats spécifiques peut modifier ses capacités de survie au sein d'une nouvelle niche écologique. D'une façon générale, quand on introduit dans un sol des bactéries isolées d'animaux ou cultivées en laboratoire, les bactéries survivant le plus longtemps correspondent à celles d'origine animale (Kudva *et al.*, 1998). D'autre part, il a été montré qu'*E. coli* O157:H7 présente un plus fort taux de survie dans un sol lorsqu'il a été isolé directement de fèces d'animaux plutôt que lorsqu'il a été cultivé en laboratoire (Scott *et al.*, 2006). Le passage dans le tractus gastro-intestinal semblerait donc favoriser la survie des bactéries dans des environnements secondaires, notamment carencés en nutriments. Les modalités d'incubation (variations de température, renouvellement du milieu et concentrations en nutriments) s'avèrent également primordiales pour la survie des populations d'*E. coli*. En effet, dans des expérimentations de survie dans l'eau, des populations naturelles d'*E. coli* de l'eau montrent un meilleur maintien en système ouvert et non contrôlé (incubation dans le lit de la rivière) qu'en système fermé et contrôlé (en laboratoire) (Hardina & Fujioka, 1991). Muirhead *et al.* (2006) ont quant à eux observé des différences d'attachement d'*E. coli* aux particules de sol, en fonction de l'origine environnementale ou de laboratoire de la souche. Ils ont montré que, lors de pluies artificielles, la souche d'origine environnementale présente une plus faible adsorption aux particules de sol que la souche de laboratoire, ce qui favorise son transfert au travers de colonnes de sol. Recorbet *et al.* (1992) ont également mis en évidence des différences de survie entre une souche isolée de fèces (*E. coli* K12 P678) et une souche de laboratoire génétiquement modifiée (*E. coli* K12 EL1003). Lors de la co-inoculation de ces deux souches dans du sol, la souche environnementale présente pendant 22 jours des niveaux de population plus élevés que la souche génétiquement modifiée, que le sol soit stérile ou non (*i.e.* qu'il y ait ou non des interactions avec la microflore du sol).

Dans ce chapitre, des inoculations en microcosmes de sol ont été conduites dans l'objectif d'évaluer si des souches d'*E. coli* de diverses origines environnementales (*i.e.* issues de bouse et de différents sols) présentent des capacités de survie différentes dans un environnement secondaire que constitue le sol. Par ailleurs, nous avons voulu évaluer dans quel état physiologique se trouvent les populations d'*E. coli*. Pour ce faire, la mise au point d'outils moléculaires a été initiée de façon à déterminer si les cellules sont en phase de division ou de dormance et si elles adoptent ou non un comportement similaire à celui de populations telluriques. Au-delà de cette mise au point méthodologique, il s'agit aussi de vérifier les hypothèses émises à la suite de l'étude de la dynamique des populations d'*E. coli* dans le sol (chapitre 2).



La démarche expérimentale a pour objectif de comparer l'état physiologique d'*E. coli* à celui d'une population tellurique témoin, adaptée au sol, *Pseudomonas* spp. fluorescents sur la base d'essais rendant compte de l'expression de marqueurs génétiques d'état physiologique différemment exprimés en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. Les marqueurs choisis sont les 6 gènes préalablement décrits dans le chapitre III de la synthèse bibliographique ; à savoir, *ftsZ*, *fis* et *rpoZ* comme spécifiquement transcrits en phase exponentielle de croissance et, *rpoS*, *dps* et *rmf* en phase stationnaire de croissance.

## II. Matériels et méthodes

Des expérimentations d'inoculations ont été réalisées afin d'évaluer les capacités de survie de souches d'*E. coli* présentant des origines environnementales différentes.

### II.1. Inoculation en milieu nutritif liquide riche

La cinétique de croissance de la souche *E. coli* K12 DH10B a été suivie en milieu Luria-Bertani modifié (LBm, LB modifié avec 5 g L<sup>-1</sup> NaCl au lieu de 10 g L<sup>-1</sup>) à 37 °C et sous agitation à 180 rpm. A chaque temps de prélèvement (18 entre 0 et 48h), la densité optique (DO<sub>600 nm</sub>) a été mesurée à 600 nm et 2 échantillons de 5 mL de culture ont été prélevés stérilement. Un aliquot a été traité à la rifampicine (concentration finale de 300 µg mL<sup>-1</sup>), un antibiotique connu pour inhiber la transcription. Les cellules ont alors été centrifugées pendant 10 minutes à 6000 rpm. Après élimination du surnageant, les culots lavés ont été congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80 °C jusqu'à extraction des ARNs.

### II.2. Inoculations en microcosmes de sol

#### II.2.1. Origine des souches

La souche *E. coli* K12 DH5α a été utilisée comme souche de laboratoire. Plusieurs souches environnementales ont été isolées à partir de différents échantillons provenant de l'alpage de Bise : à partir d'une déjection bovine, d'échantillon de sols rhizosphériques (0-5 cm) sous la *Poa*, et sous le *Rumex*. Ces souches ont été isolées après culture sur MUG-Ec agar à 44 °C. L'appartenance de ces souches à l'espèce *E. coli* a été confirmée par croissance sur milieu TTC-Tergitol7 à 44 °C, par galerie API-20E et par séquençage d'un fragment du gène *uidA*.



## II.2.2. Inoculation des microcosmes de sol

### *Préparation des cellules*

Chaque souche a été mise en culture en milieu LB à partir d'une préculture. Après croissance sur une nuit à 37 °C, la DO<sub>600 nm</sub> a été mesurée et les cultures centrifugées à 5500 g pendant 20 minutes à température ambiante. Les culots bactériens ont été lavés 2 fois avec 5 mL de NaCl à 0,8 % puis resuspendus dans du tampon phosphate à une concentration finale de 10<sup>8</sup> cellules par ml (soit 1 unité DO<sub>600 nm</sub>).

### II.2.2.i. Préparation des microcosmes

Après tamisage des sols sous *Poa* et sous *Rumex* à 2 mm, des microcosmes d'environ 10 g de sol humide ont été préparés (soit l'équivalent de 5 g sec) en triplicats pour chaque sol, temps d'échantillonnage et souche (*i.e.* 180 microcosmes au total).

Une bouse fraîche avec son cortège microbien a également été mélangée avec du sol rhizosphérique sous *Poa*, et sous *Rumex* (50 % bouse fraîche/50 % sol).

### II.2.2.ii. Inoculation des souches

Après inoculation de 5. 10<sup>8</sup> cellules dans chaque microcosme, ces derniers ont été incubés quotidiennement 12 h, à 20 °C et 12 h à 4 °C de façon à simuler l'alternance des températures existant entre le jour et la nuit dans l'environnement. Les microcosmes ont ensuite été analysés aux temps 0h, 3h, 18h, 24h, 48h, 7 jours (168h), 10 jours (240h), 14 jours (336h), 28 jours (672h) et 60 jours (1440h).

### II.2.2.iii. Enumération des *E. coli*

Des échantillons de 1,5 g de sol ont été prélevés stérilement à chaque date d'échantillonnage et dilués dans 9 mL de tampon PBS. Des dilutions en série de ces suspensions de sol ont ensuite été réalisées (le volume de sol restant a été congelé dans l'azote liquide puis conservé à -80 °C pour l'extraction des ARNs). L'énumération d'*E. coli* a été réalisée sur milieu TTC-tergitol7 agar, à 44 °C. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de UFC (± e.t.) par gramme de sol sec.

Tableau 14 : Séquences, températures d'hybridation des amorces ainsi que les longueurs amplifiées chez *E. coli* et *Pseudomonas* spp. Les cycles PCR étaient de 5 min à 95°C ; 30 cycles de 30s à 95°C, 30s à la température d'hybridation, 30s à 72°C ; 10 min à 72°C. Les chiffres entre parenthèses indiquent la position de la 1<sup>ère</sup> base de l'amorce sur le gène à amplifier

	Séquence (5'→3')	Longueur amplifiée	T° d'hybridation
<i>A. E. coli</i>			
<i>rpoS</i> forward (267)	CTCTCGCCGCCGGATG	265	59°C
reverse (546)	TCGTAAAGGAGCTGAACGTTT		
<i>rmf</i> forward (35)	CACATCAACGTGGTTATCAG	170	56°C
reverse (225)	CATTACTACCCTGTCCGC		
<i>dps</i> forward (85)	ACAGTAGAGTTGCTGAATCG	190	56°C
reverse (295)	ATCCAGATGATCGATCAGTG		
<i>rpoZ</i> forward (4)	GCACGCGTAACTGTTTCAGG	180	60°C
reverse (203)	GCAGCGCGATTACAGTGGT		
<i>ftsZ</i> forward (245)	GATGAGGATCGCGATGCA	220	60°C
reverse (482)	GATCACTGAACTGTCCAAGC		
<i>fis</i> forward (135)	GGATGTGAATGACCTCTATG	190	49°C
reverse (345)	TTAGTTCATGCCGTATTTTTTC		
<i>B. Pseudomonas</i> spp.			
<i>rpoS</i> forward (219)	GCCGGGTTTGACATCGACG	300	59°C
reverse (538)	CAACACAAATACATTGATTACAC		
<i>rmf</i> forward (3)	GAGAAGACTTAAGCGTGATCCG	205	53°C
reverse (230)	GTGCCRGTSKRCCGACCCAGTTG		
<i>dps</i> forward (1)	ATGGMAATCRATATYGGWTTTCMG	160	45°C
reverse (284)	GSTGACRTTCCAGTGRAAG		
<i>rpoZ</i> forward (58)	ATGGCCC CGTMACYGTTGAAG	185	60°C
reverse (265)	CGGTHGGYTTGTCGTTTTCCCA		
<i>ftsZ</i> forward (70)	CAAGCGCATGCAGATCG	175	53°C
reverse (262)	GATCACTGAACTGTCCAAGC		
<i>fis</i> forward (20)	TGAAACAGCACCTCAMYACSCCG	210	56°C
reverse (253)	GTCTGGTTSCCCTTSACGTRGTTTC		

## II.3. Extraction des ARNs et rétrotranscription

### II.3.1. A partir des cultures bactériennes en milieu liquide

Les ARNs totaux ont été extraits par la méthode du trizol (Simms *et al.*, 1993, protocole détaillé en annexe). Brièvement, les culots conservés à -80 °C ont été broyés à froid (2 fois 2 minutes) dans une solution de resuspension, en présence d'EDTA (0,5 M), à l'aide d'un vibro-broyeur (Thermo Fisher Scientific Inc, Illkirch, France). Les ARNs ont ensuite été extraits en présence de trizol et d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (CAI) 24/1 (V/V). Après précipitation des ARNs à l'isopropanol, les culots ont été repris dans du tampon Tris-EDTA (1 mM) puis traités à la DNase (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, USA) de façon à éliminer l'ADN restant. La pureté des ARNs a été vérifiée par dépôts sur gel d'agarose 1,2 % et par dosage au Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA). Enfin, une PCR sur le gène *rpoS* d'*E. coli* a été réalisée (Tableau 14) pour vérifier qu'aucune trace d'ADN n'était présente. Si la PCR se révélait positive, un nouveau traitement DNase était réalisé jusqu'à ce que la PCR soit négative.

Une fois toute trace d'ADN éliminée, une rétrotranscription non spécifique a été effectuée à l'aide du kit Universal RiboClone® cDNA synthesis system (Promega, Charbonnière, France) dont le protocole est présenté en annexe III. Les ADNc synthétisés ont alors été purifiés sur colonne à l'aide du kit NucleoSpin (Macherey-Nagel EURL, Hoerdt, France) puis élués dans 40 µL d'eau ultra pure (UP). Après dosage au Nanodrop ND1000, les ADNc ont été dilués à 10 ng µL<sup>-1</sup> avec de l'eau UP puis conservés à -20 °C jusqu'à utilisation. Chacun des 6 gènes marqueurs de l'état physiologique ont alors été amplifiés sur 50 ng d'ADNc comme décrit Tableau 14.

### II.3.2. A partir des microcosmes de sol

Le protocole est donné en annexe III. Brièvement, il consiste à broyer 0,5 g de sol équivalent sec avec des billes de zirconium, directement dans un tampon de lyse (500 µL de solution d'extraction et 500 µL de phénol chloroforme alcool isoamylique 25/24/1 v/v/v). Suite à ce broyage, les échantillons sont centrifugés à 16000 g pendant 10 minutes et à 4 °C, le surnageant est récupéré puis une 2<sup>nde</sup> extraction est réalisée. Ensuite, les résidus protéiques sont éliminés par traitement au CAI. Après une nouvelle centrifugation à 16000 g à 4 °C pendant 10 minutes, le surnageant est récupéré. Puis, les acides nucléiques qu'il contient sont précipités avec de l'isopropanol à température ambiante. Le culot est récupéré et nettoyé 2 fois à l'éthanol 70 % froid. Il s'en suit une étape de purification des ARNs sur colonne

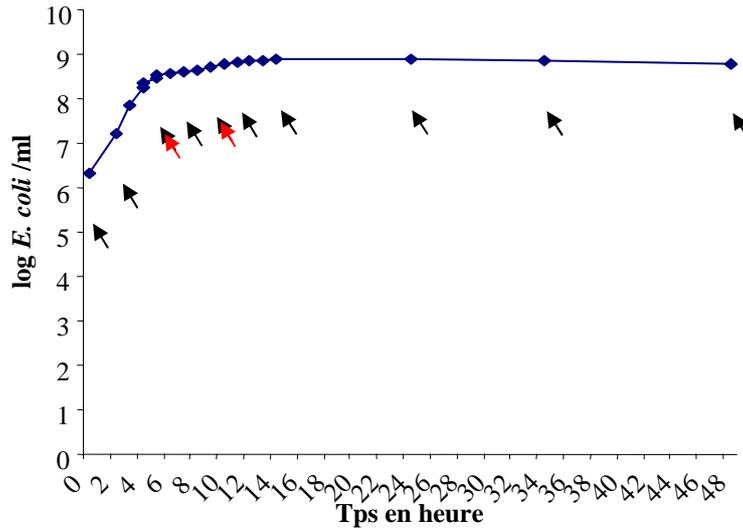


Figure 33 : Cinétique de croissance d'*E. coli* DH10B en milieu LBm à 37°C. Les flèches en noires correspondent aux différents temps auxquels les ARN ont été extraits. En rouge, ceux traités à la rifampicine. Les concentrations sont exprimées en log *E. coli* par ml de culture.

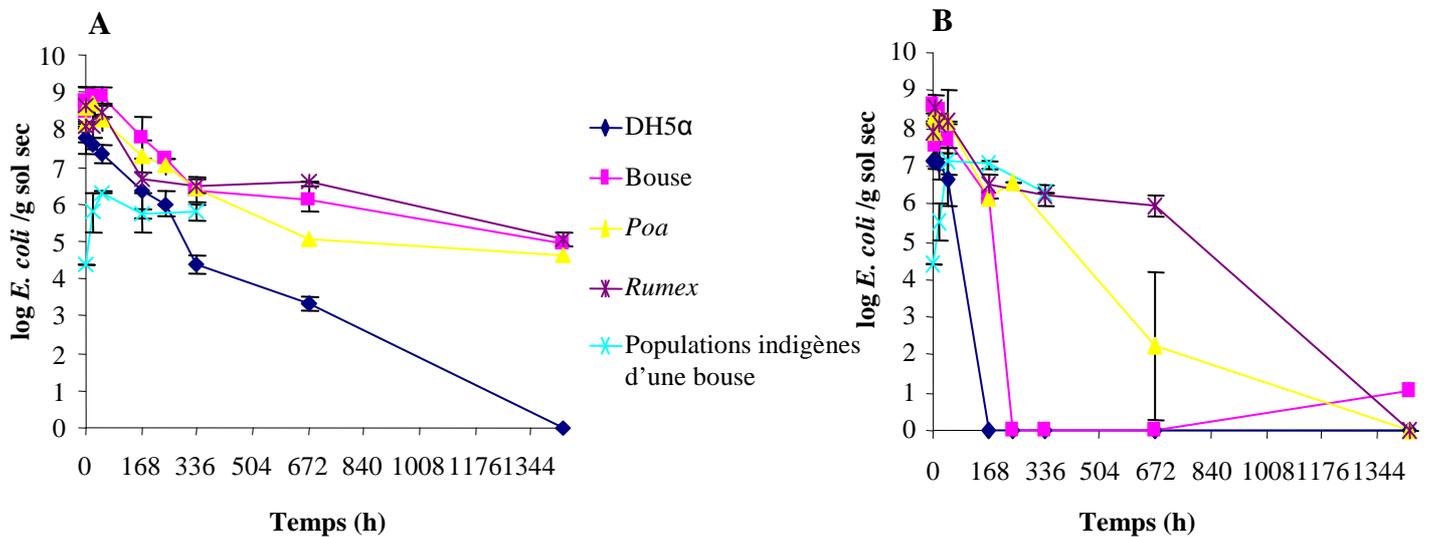


Figure 34 : Cinétiques de survie des souches d'*E. coli* d'origine différente dans des microcosmes de sol de surface prélevé sous la *Poa* (A) et le *Rumex* (B). En bleu : souche DH5α, en rose : souche isolée d'une bouse, en jaune : souche isolée d'un sol sous *Poa*, en violet : souche isolée d'un sol sous *Rumex* et en bleu ciel, les populations indigènes d'une bouse. Les concentrations sont exprimées en log *E. coli* par g de sol sec.

effectuée avec le kit RNeasy mini kit (Qiagen, USA). Après élution dans de l'eau exempte de RNase, un 1<sup>er</sup> traitement à la DNase (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, USA) est réalisé afin d'éliminer les ADN. Cette opération de purification sur colonne et de traitement à la DNase est ensuite répétée. Les ARNs extraits sont alors déposés sur gel d'agarose 1,2 % et dosés au Nanodrop ND1000 afin de vérifier leur pureté et leur concentration. Une PCR sur le gène *rrs* avec les amorces universelles pA/pH (voir partie 3) est effectuée afin de vérifier que toute trace d'ADN a été éliminée suite aux étapes de purification. Si tel n'est pas le cas, les ARNs sont de nouveau traités à la DNase jusqu'à disparition de toutes traces d'ADN. Les ARNs purs sont rétrotranscrits aléatoirement avec le kit ImPromII™ Reverse Transcription System (Promega, Charbonnière, France) afin d'obtenir des ADNc.

A partir d'une quantité fixe d'ADNc (50 ng), des PCR semi-quantitatives sont réalisées pour amplifier les 6 gènes marqueurs suivant les protocoles décrits Tableau 14. Les amplifiats (5 µl) sont alors déposés sur gel d'agarose après des nombres de cycles d'amplification différents (tous les 2 à 3 cycles). Pour un nombre de cycles d'amplification identique, l'intensité des signaux obtenus pour chaque marqueur est alors comparée sur l'ensemble des échantillons extraits à différents temps au cours des cinétiques de survie.

## II.4. Marqueurs moléculaires de l'état physiologique

### II.4.1. Analyses phylogénétiques

Les génomes séquencés utilisés dans cette étude phylogénétique sont disponibles dans la base de données du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). Quand les génomes n'étaient pas entièrement séquencés, les séquences nucléotidiques d'intérêt ont été obtenues suite à des analyses d'homologie par BLAST (pour *Basic Local Alignment Search Tool* ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les numéros d'accèsion des séquences utilisées dans cette étude sont récapitulés dans l'annexe III.

Les séquences nucléotidiques ont été alignées avec le logiciel ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). Les régions conservées ont été sélectionnées à l'aide du programme Gblocks (Castresna, 2000). La moitié de trous dus à l'alignement a été autorisée au sein de chaque bloc conservé.

Nous avons choisi de construire les arbres phylogénétiques avec deux méthodes différentes, la méthode du plus proche voisin ou *Neighbor-Joining* (NJ, qui compare les séquences 2 par 2) et la méthode du maximum de vraisemblance ou *Maximum Likelihood* (ML, qui compare,

A

Arbre *rpoS*

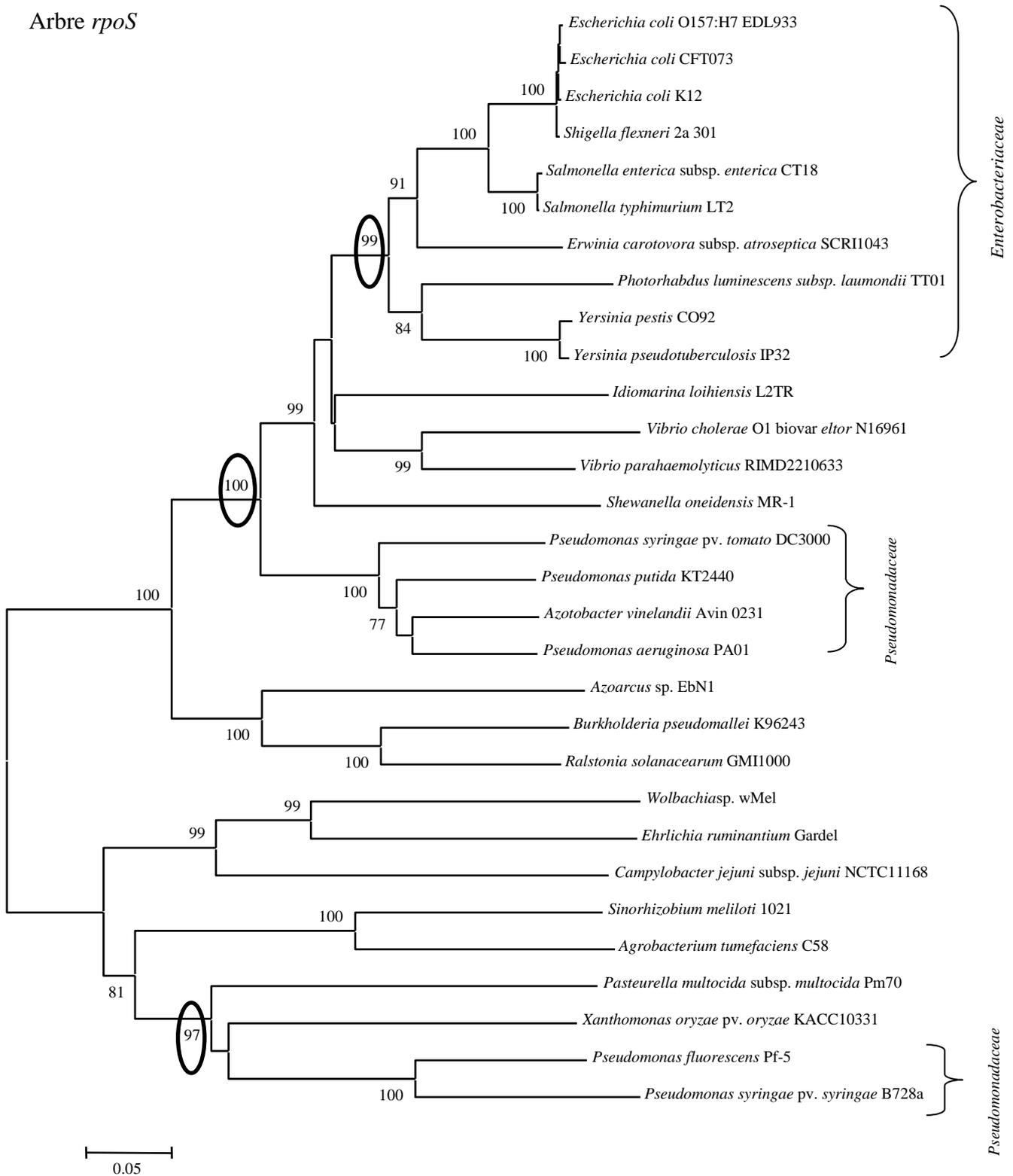


Figure 35 : Arbres phylogénétiques obtenus par la méthode du plus proche voisin (NJ) sur les différents marqueurs de l'état physiologique : A pour le gène *rpoS*; B pour le gène *rmf*; C pour le gène *dps* ; D pour le gène *fts*; E pour le gène *rpoZ*; F pour le gène *ftsZ*

pour chaque site, toutes les séquences entre elles). Pour la méthode NJ (Saitou et Nei, 1987), le modèle Kimura à 2 paramètres (Kimura, 1980) a été choisi. Les arbres ont ensuite été calculés avec le logiciel MEGA3.1 (Kumar *et al.*, 2001). Pour la méthode ML (Felsenstein, 1981), les alignements obtenus avec ClustalW ont été transformés en format phylip en utilisant le programme Seaview (Galtier *et al.*, 1996). Les arbres ont ensuite été calculés avec le logiciel phym1 (Guindon & Gascuel, 2003) en utilisant le modèle HKY (Hasegawa *et al.*, 1985).

Les analyses de bootstraps (probabilité pour qu'un embranchement existe) ont été effectuées pour vérifier la robustesse de chaque topologie. 500 arbres ont été calculés pour la méthode NJ et 100 arbres pour la méthode ML. Les arbres en ML ont ensuite été dessinés avec le logiciel ATV (<http://www.genetics.wustl.edu/eddy/atv/>) et les arbres en NJ avec le logiciel MEGA3.1. Toutes les valeurs de bootstraps inférieures à 50 (c'est-à-dire que l'embranchement existe dans moins de 50 % des arbres) ont été éliminées.

Les ratios de substitutions nonsynonymes/synonymes (dN/dS;  $\omega$ ) ont été calculés en utilisant la méthode Gojobori et Nei (Nei & Gojobori, 1986).

#### II.4.2. Dessin des amorces et test de spécificité

##### II.4.2.i. Amorces et protocoles PCR

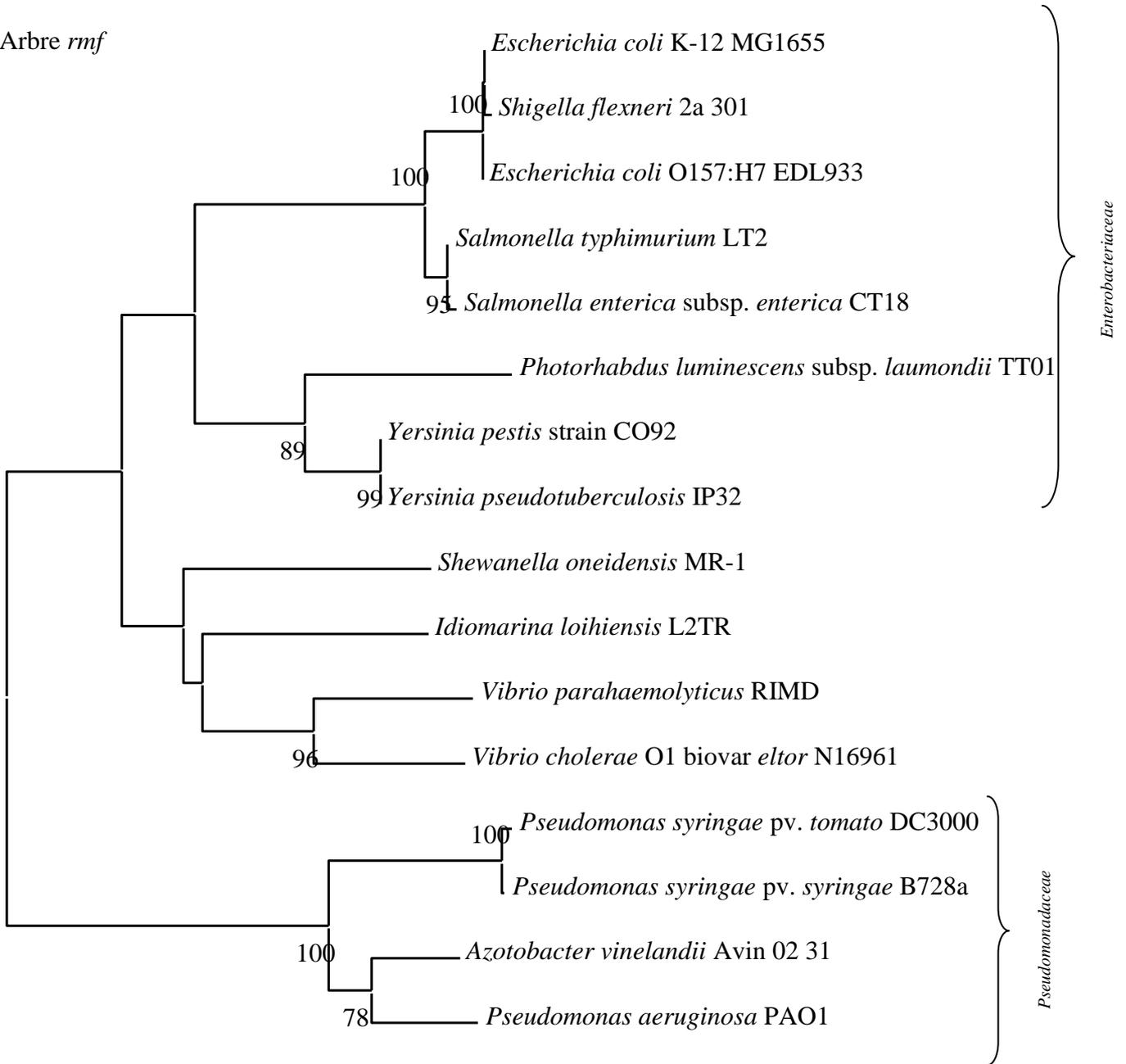
Pour chacun des 6 gènes marqueurs de l'état physiologique, des régions conservées au sein de chaque groupe taxonomique d'intérêt ont été recherchées à partir des alignements de séquence obtenus précédemment. Des amorces spécifiques à ces groupes ont été dessinées au sein de ces régions. Le Tableau 14 récapitule les séquences des différentes amorces, la longueur des fragments amplifiés, leurs températures d'hybridation et les protocoles d'amplification par PCR.

Les protocoles PCR ont été mis au point sur différentes souches d'*E. coli*. Les souches testées étaient *E. coli* DH10B (souche de laboratoire) et *E. coli* B4V, B5, B510V, B1, B3, B9, B110, B210, B310, B510V et B910 (souches environnementales isolées dans l'eau à l'exutoire du bassin versant de Bise, en 2004).

Pour les amorces *Pseudomonas* spp., les protocoles ont tout d'abord été élaborés à partir de souches de *Pseudomonas fluorescens* (PITR2, CM1a2, F113, P97-30, K94-31, CHA0, PILH1, P97-26) puis testés sur d'autres espèces du genre *Pseudomonas* (*i.e.* *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. asplenii*, *P. chlororaphis*, *P. citronellolis*, *P. fragilis*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. viridiflava*).

# B

Arbre *rmf*



#### II.4.2.ii. Spécificité des amorces

La spécificité des amorces a ensuite été testée sur les souches appartenant aux espèces proches phylogénétiquement d'*E. coli* (*Pectobacterium carotovorum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter aerogenes* et *Serratia marescens*) et de *Pseudomonas* spp. (une Pseudomonadale, *Acinetobacter calcoaceticus* et deux  $\beta$ -protéobactéries, *Burkholderia cenocepacia* et *Ralstonia solanacearum* GMI1000).

### III. Résultats

#### III.1. Cinétiques de croissance d'*E. coli* en milieu liquide et dans du sol

Les cinétiques de croissance (i) d'*E. coli* K12 DH10B en milieu liquide LB et (ii) des souches de laboratoire et environnementales, en microcosmes de sol, sont présentées respectivement Figure 33 et Figure 34.

En milieu liquide, aucune phase de latence n'a été observée et la phase exponentielle a duré environ 7h avant que la phase stationnaire ne soit atteinte. Au bout de 48h, aucune phase de déclin n'a été observée.

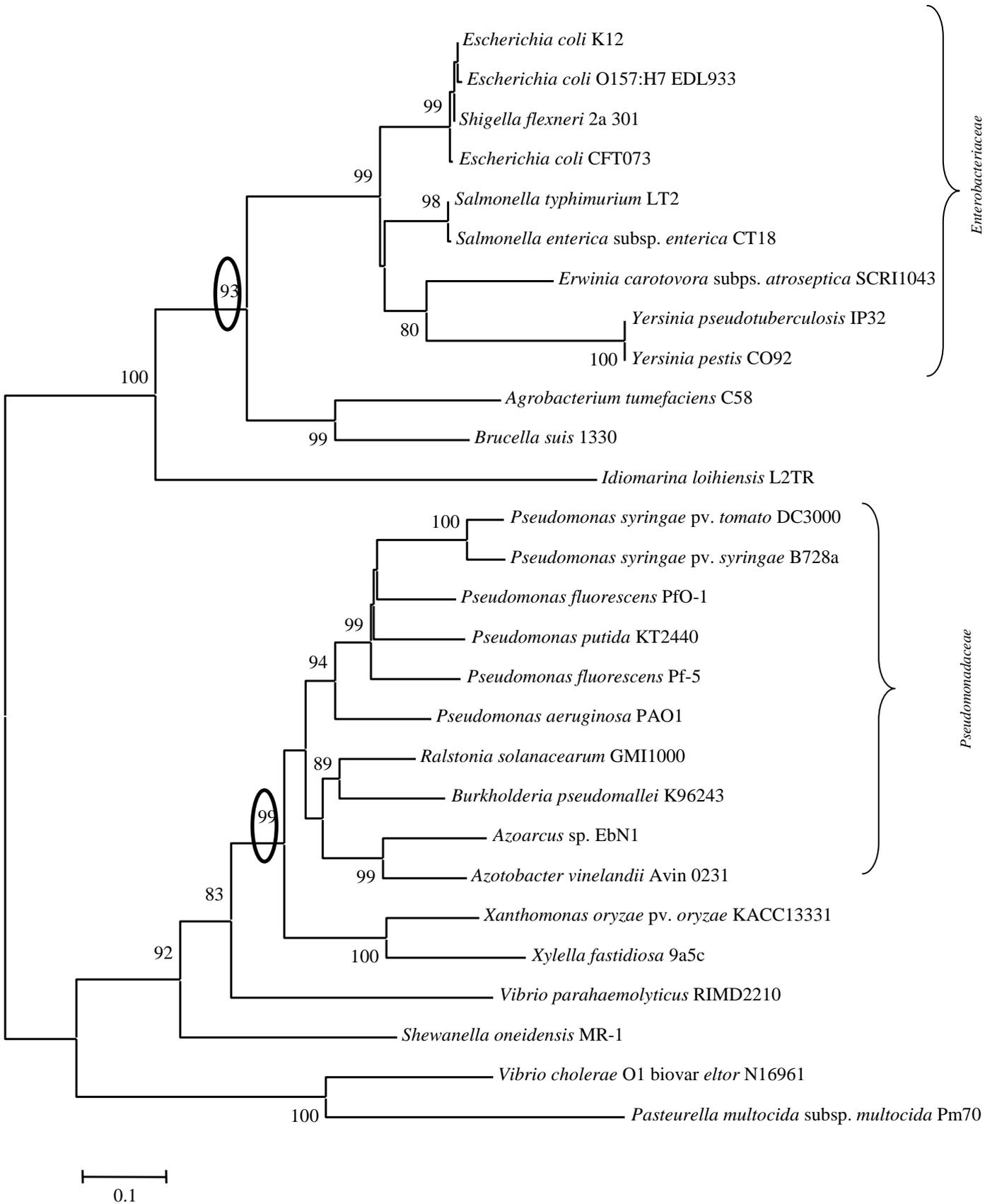
En microcosmes de sol, pour chaque souche inoculée, une phase de déclin a été observée pendant 7 à 14 jours après l'inoculation (les effectifs passent de  $10^8$  à environ  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  de sol). Pour chaque sol, des différences comportementales peuvent être observées en fonction de l'origine environnementale de la souche bactérienne. En effet, dans le sol sous *Poa*, la souche DH5 $\alpha$  ne survit pas. On note une décroissance continue et une disparition au bout de 2 mois, la limite de détection étant d'environ 10 UFC  $g^{-1}$  de sol. Au contraire, les 3 autres souches (issues d'une bouse, du sol sous *Poa* et sous *Rumex*) se maintiennent à des effectifs de l'ordre de  $10^5/10^6$  cellules  $g^{-1}$  de sol durant les 2 mois de l'expérimentation.

Dans le sol sous *Rumex*, d'autres comportements ont été observés. La souche DH5 $\alpha$  ne se maintient pas. Elle disparaît au bout d'une semaine (168 h). La souche issue de la bouse disparaît après 10 jours d'incubation (240 h). Pour la souche issue de la *Poa*, sa disparition survient au bout de 2 mois. Enfin, la souche issue du *Rumex* se maintient plus longtemps mais finit par disparaître au bout des 2 mois d'incubation.

En ce qui concerne les microcosmes populations indigènes d'une bouse/sol, la survie des populations naturelles d'*E. coli* a été étudiée pendant 2 semaines. Les dynamiques observées

C

Arbre *dps*



sont très différentes de celles des souches d'*E. coli* introduites après avoir été cultivées au laboratoire. Le déclin initial précédemment observé n'a pas eu lieu dans ces microcosmes. Au contraire, une phase de croissance a été observée jusqu'à 18h (environ  $10^4$  UFC  $g^{-1}$  à 0h et environ  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  à 18h). Par la suite, les concentrations se sont stabilisées à  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  de sol pendant les deux semaines de l'expérimentation sur ces microcosmes.

### III.2. Etude moléculaire des marqueurs de l'état physiologique

#### III.2.1. Etude phylogénétique

Les résultats obtenus concernent les familles des *Enterobacteriaceae* et des *Pseudomonadaceae*. Les différents arbres obtenus par la méthode NJ sont présentés Figure 35 et ceux obtenus par la méthode ML en annexe III.

##### III.2.1.i. Les marqueurs de phase stationnaire

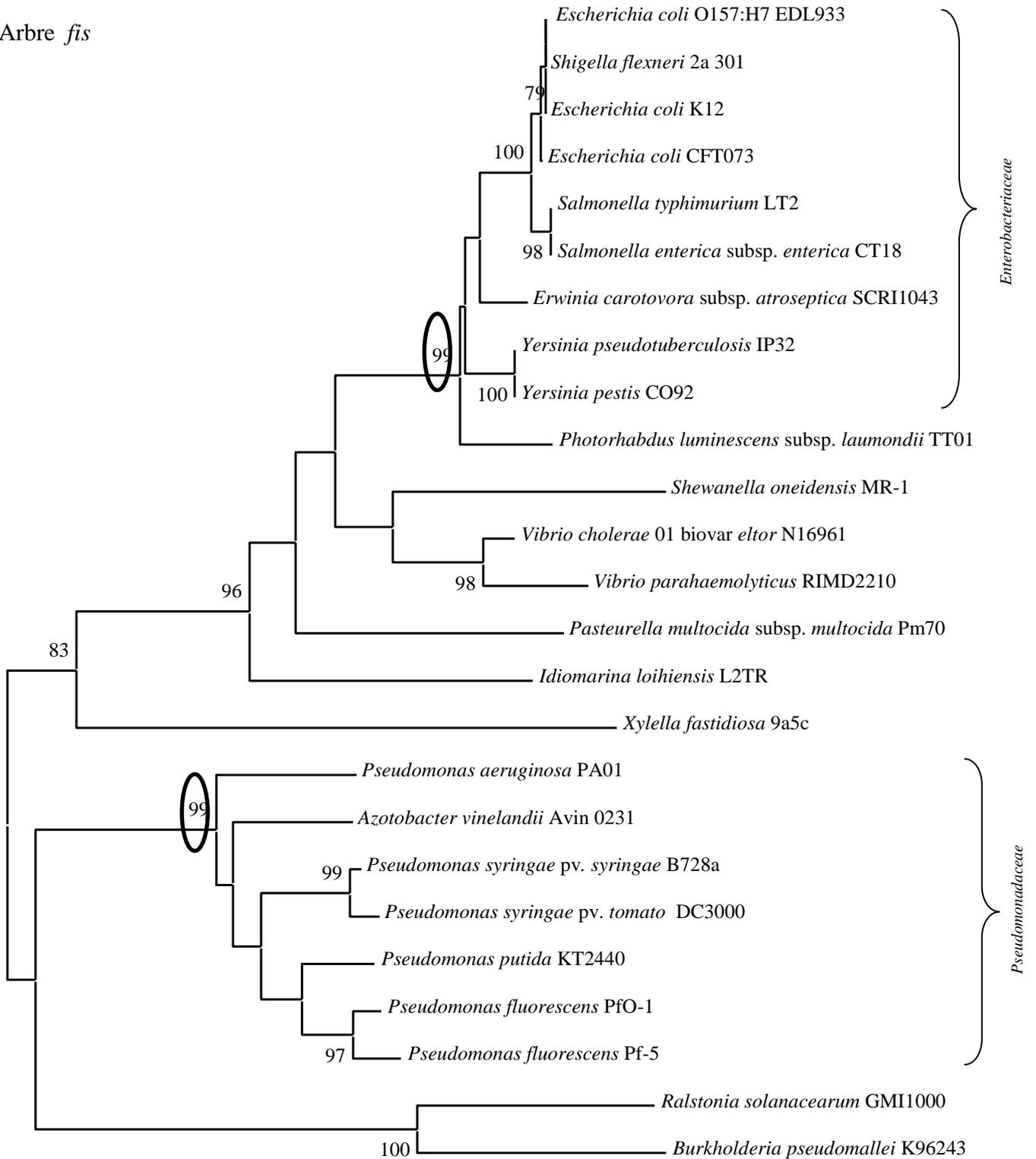
*rpoS* présente une phylogénie congruente avec l'ADNr 16S pour les groupes des *Enterobacteriaceae* et des *Pseudomonadaceae* avec des nœuds robustes avec les deux méthodes (bootstraps > 90 %) sauf pour *P. fluorescens* Pf-5 et *P. syringae* pv. *syringae* B728a avec la méthode NJ. Les valeurs de dN/dS révèlent une sélection positive (>1), c'est-à-dire qu'il y a plus de substitutions non synonymes (*i.e.* qui entraînent des changements d'acides aminés dans la séquence protéique) que de substitutions synonymes (*i.e.* n'entraînant pas de modification de la séquence protéique) (Tableau 15).

Comme cela a été évoqué dans la synthèse bibliographique, peu de séquences *rmf* sont disponibles dans les banques de données. Ainsi, toutes les séquences connues proviennent de  $\gamma$ -protéobactéries. Toutes les familles d'intérêt apparaissent monophylétiques avec les deux méthodes utilisées (les valeurs de bootstraps étant plus élevées pour la méthode ML). Le gène *rmf* subit de fortes pressions de sélection comme l'atteste sa valeur de dN/dS inférieure à 1 (Tableau 15).

La phylogénie observée avec le gène *dps* présente de l'incongruence avec celle de l'ADNr 16S. En effet, des séquences d' $\alpha$ -protéobactéries forment un groupe monophylétique, proche du groupe des *Enterobacteriaceae*, supporté par de fortes valeurs de bootstraps (>93 % pour les 2 méthodes). De plus, les *Pseudomonadaceae*, les  $\gamma$ -protéobactéries des genres *Xanthomonas* et *Xyllela* groupent avec les  $\beta$ -protéobactéries ce qui est incongruent avec la phylogénie basée sur l'ADNr 16S. Au sein de ce groupe, la distinction entre

D

Arbre *fis*



0.1

*Pseudomonas* spp. et les  $\beta$ -protéobactéries n'est pas supportée par des valeurs de bootstraps significatives (<50 %). *Azoarcus* sp. EbN1, une  $\beta$ -protéobactérie, et *Azotobacter vinelandii*, appartenant au groupe des *Pseudomonadaceae* (Rediers *et al.*, 2004), forment un groupe distinct des autres séquences de *Pseudomonadaceae*. Ces incongruences sont corrélées à une forte pression de sélection sur la séquence de ce gène comme l'attestent les valeurs de dN/dS inférieures à 1 notamment pour la famille des *Enterobacteriaceae* (Tableau 15).

### III.2.1.ii. Les marqueurs de phase exponentielle

Les phylogénies observées avec *fis* et *rpoZ* sont partiellement congruentes avec celle de l'ADNr 16S. Les groupes des *Enterobacteriaceae* et des *Pseudomonadaceae* sont monophylétiques. Pour *fis*, ces deux groupes ne sont pas supportés par des valeurs de bootstraps significatives, contrairement à *rpoZ*. Si aucune pression de sélection n'est observée par le calcul des dN/dS à partir des séquences du gène *fis*, *rpoZ* présente une pression de sélection pour le groupe des *Enterobacteriaceae* (dN/dS<1 ;Tableau 15).

En ce qui concerne *fisZ*, alors que les groupes des  $\alpha$ - et  $\beta$ -protéobactéries sont très robustes avec de fortes valeurs de bootstraps, celui des  $\gamma$ -protéobactéries ne l'est pas avec de faibles valeurs de bootstraps et de grandes longueurs de branches. Par contre, nos familles d'intérêts, à savoir les *Enterobacteriaceae* et les *Pseudomonadaceae*, forment des groupes très robustes avec des valeurs de bootstraps proches de 100 (en particulier pour la méthode NJ) et une faible pression de sélection (dN/dS>1).

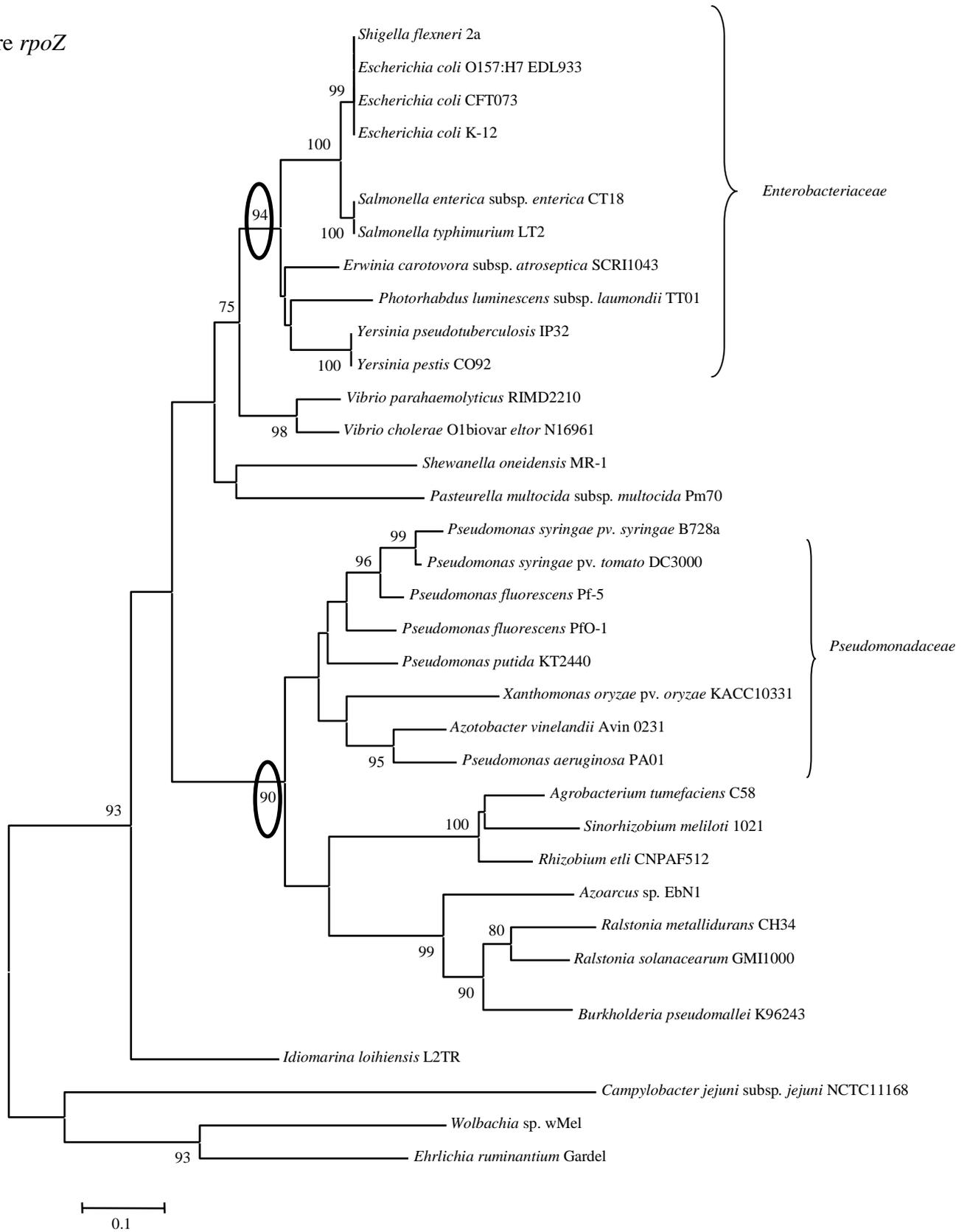
En conclusion, pour chacun des 6 gènes, nos familles d'intérêt sont monophylétiques. A partir des alignements des séquences nucléotidiques, il est ainsi possible d'envisager le dessin d'amorces amplifiant spécifiquement ces gènes marqueurs de l'état physiologique des bactéries.

### III.2.2. Dessin des amorces et contrôle de leur spécificité

Les différentes amorces ont été dessinées à partir des alignements d'une dizaine de séquences nucléotidiques d'*E. coli*, d'une dizaine séquences de *Pseudomonas* spp. et de séquences des plus proches voisins (e.g. *S. enterica* subsp. *enterica* CT18 pour *E. coli* et *A. vinelandii* Avin0231 pour *Pseudomonas* spp.). L'objectif ultime étant de suivre l'expression des gènes marqueurs par RT-PCR quantitative en temps réel, les jeux d'amorces ont été définis afin d'amplifier de courts fragments d'ADN (<300 pb). Les séquences des

# E

Arbre *rpoZ*



amorces sont présentées Tableau 14. Pour toutes les amorces, des signaux ont été obtenus pour toutes les souches d'*E. coli* et de *Pseudomonas* spp. testées (voir Matériel et Méthodes) excepté pour le couple d'amorces devant amplifier le gène *ftsZ* de *Pseudomonas* spp. qui montrait une aspécificité (présence de bandes multiples, Figure 36). Pour chaque jeu d'amorces, les produits PCR obtenus pour *E. coli* et *Pseudomonas* spp. ont ensuite été séquencés de façon à vérifier leur identité. Chaque fragment correspondait bien au gène ciblé. La Figure 36 montre un exemple de résultats PCR obtenus sur les gènes *rmf* et *dps* pour 5 souches d'*E. coli*. Ensuite, les jeux d'amorces ont été testés sur de proches voisins appartenant aux genres *Erwinia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Serratia* et *Enterobacter* pour *E. coli* et *Burkholderia*, *Acinetobacter* et *Ralstonia* pour *Pseudomonas* spp.. Les résultats des tests de spécificité des jeux d'amorces sont présentés Tableau 16. Presque toutes les amorces amplifient, comme attendu, spécifiquement soit *E. coli* soit *Pseudomonas* spp., hormis *Pseudomonas* spp. pour le gène *ftsZ*. Les 2 souches de *Salmonella* testées donnent un signal positif de faible et de moyenne intensités avec les amorces ciblant *rpoZ* et *dps* d'*E. coli*, respectivement et la souche *E. chrysanthemi* 3937 donne également un signal de faible intensité pour *fts*. Quant aux amorces ciblant les *Pseudomonas* spp., les amorces *rpoZ* amplifient fortement *A. calcoaceticus* et plus faiblement *B. cenocepacia*.

Enfin, les jeux d'amorces spécifiques à *E. coli* ont été testés sur *Pseudomonas* spp. et *vice-versa*. Comme attendu, aucune amplification croisée n'a été observée.

### III.2.3. Expression des marqueurs

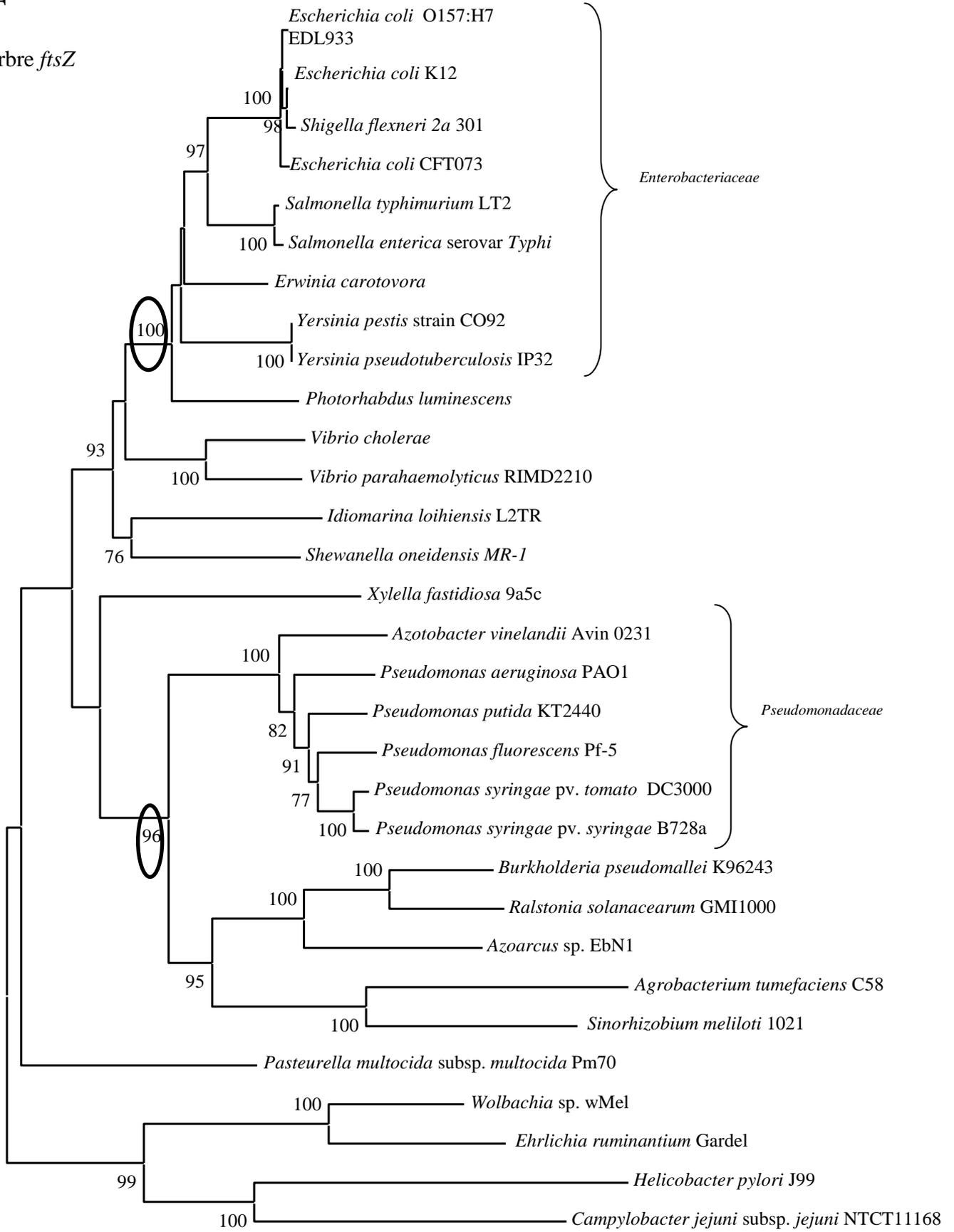
#### III.2.3.i. En milieu de culture riche

Les ARNs ont été extraits sur 12 échantillons : à 0h ; à 2h et 5,5h lors de la phase exponentielle ; à 8h lorsque la phase stationnaire est atteinte ; à 10h, 12h, 14h ainsi qu'à 24h, 34h et 48h en phase stationnaire tardive. De plus, deux échantillons traités à la rifampicine ont été extraits (à 5,5 h et 10 h). La Figure 37 représente la visualisation des ARNs totaux après dépôt sur gel d'agarose à 1,2 %. Tous les ARN ribosomiaux (5S, 16S et 23S) sont observables dans tous les échantillons (excepté à 0 h et à 2 h pour l'ARNr 5S) témoignant d'une bonne qualité d'extraction.

Suite à la rétrotranscription des ARNs extraits, les 6 gènes marqueurs ont été amplifiés sur tous les ADNc synthétisés. Les résultats de ces amplifications sont présentés Figure 38. Aucune différence de réponse n'est observée que les échantillons soient traités ou non à la rifampicine, mettant en évidence l'efficacité de la congélation à -80 °C dans l'azote liquide

F

Arbre *ftsZ*



0.1

pour stopper la transcription des ARNs. Les résultats obtenus à partir des échantillons traités avec cet antibiotique ne sont donc pas utilisés dans la suite de ce chapitre.

De 20 à 33 cycles PCR ont parfois été testés en fonction des marqueurs jusqu'à obtenir une réponse différentielle entre les différents échantillons.

-Pour les gènes marqueurs de la phase exponentielle de croissance :

A 25 cycles d'amplification, des signaux sont obtenus pour les gènes *rpoZ* et *ftsZ* jusqu'à 14h de croissance, l'intensité de ces signaux étant plus forte au début qu'à la fin de la cinétique. En phase stationnaire tardive, aucun signal n'est visualisé. Pour le gène *fis*, à 28 cycles, des signaux de faible intensité sont visibles jusqu'à 14h puis aucun signal n'est détecté pour la phase stationnaire tardive (Figure 38)

-Pour les gènes marqueurs de la phase stationnaire de croissance :

Pour le gène *rpoS*, 33 cycles d'amplification sont nécessaires pour obtenir des réponses différentes en fonction des échantillons. A 33 cycles, des signaux sont obtenus pour tous les échantillons entre 0h et 24h, avec un signal d'intensité plus faible à 24h. De façon inattendue, aucun signal n'est observé dans la phase stationnaire tardive. Pour le gène *rmf*, à 25 cycles, seul l'échantillon extrait après 12 h de croissance présente un signal. Par contre, à 28 cycles, un signal de faible intensité est observable à 5,5h et 10h et de plus forte intensité à 12h et 14h. A 30 cycles, des signaux sont observables pour l'ensemble des échantillons. Pour le gène *dps*, à 20 cycles, aucun signal n'est détecté ; à 25 cycles, des signaux sont visibles pour l'ensemble des échantillons ; à 23 cycles, des réponses différentielles sont obtenues entre les échantillons (présence de signaux jusqu'à 14h de culture et absence en phase stationnaire tardive)(Figure 38).

### III.2.3.ii. En microcosmes de sol

65 extractions d'ARN et rétrotranscriptions ont été réalisées ainsi que des PCR visant à amplifier 5 des 6 gènes marqueurs (*rpoZ*, *ftsZ*, *fis*, *dps* et *rmf*) (exemple Figure 39 et Figure 40). Les résultats de ces PCR sont présentés Tableau 17. Tout d'abord, une plus forte variabilité de réponses est mise en évidence pour les inoculations dans le sol sous *Poa* que dans le sol sous *Rumex*. Etant donnée la variabilité inter-microcosme existant dans le sol sous *Poa*, la variabilité intra-microcosme a été testée pour le microcosme avec du sol sous *Rumex* en réalisant 3 extractions sur le même microcosme. Une hétérogénéité de réponse a également été mise en évidence (Tableau 17).

Tableau 15 : Valeurs de dN/dS obtenues pour les familles des *Enterobacteriaceae* et des *Pseudomonadaceae* sur les différentes phylogénies. Une valeur < 1 indique une pression de sélection alors qu'une valeur >1 signifie une sélection positive.

	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>fis</i>	3,24	1,08
<i>rpoZ</i>	0,75	1,33
<i>ftsZ</i>	230,14	3,39
<i>rpoS</i>	2,44	2,97
<i>rmf</i>	0,24	0,12
<i>dps</i>	0,98	1,49

Tableau 16 : Test de spécificité des différentes amorces sur différentes espèces bactériennes. *E. coli* : vrai pour toutes les souches d'*E. coli* testées, *Pseudomonas* fluorescents : vrai pour toutes les souches de *Pseudomonas* fluorescents testées. +++ : signal fortement positif, ++ signal moyennement positif, + signal faiblement positif et – absence de signal

	<i>fis</i>	<i>rpoZ</i>	<i>ftsZ</i>	<i>dps</i>	<i>rmf</i>	<i>rpoS</i>
<i>A. Amorces définies pour E. coli</i>						
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>E. carotovora</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. chrysanthemi</i>	+	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i>	-	+	-	++	-	-
<i>S. enteritidis</i>	-	+	-	++	-	-
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>B. Amorces définies pour Pseudomonas spp.</i>						
<i>Pseudomonas</i> fluorescents	+++	+++	-	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas</i> (11 genres)	+++	+++	-	+++	+++	+++
<i>A. calcoaceticus</i>	-	+++	-	-	-	-
<i>B. cenocepacia</i>	-	+	-	-	-	-

Les marqueurs spécifiques de la phase exponentielle répondent de façon contrastée. L'ADNc du gène *fis* n'est jamais détecté dans les 65 échantillons. L'ADNc du gène *ftsZ* n'est détecté qu'une seule fois dans un échantillon provenant du mélange entre le sol et les populations indigènes d'une bouse fraîche, après 3h d'incubation, ce qui correspond, d'après la cinétique de survie présentée Figure 34, à la phase exponentielle de croissance. L'ADNc du gène *rpoZ* est plus fréquemment amplifié puisque qu'un signal est observé au moins une fois pour chaque condition (réplicats d'extraction ou réplicats de microcosme) et plus souvent à partir de 48h d'incubation. En ce qui concerne les marqueurs spécifiques de la phase stationnaire, le gène *rmf* est rarement détecté (1 microcosme sur 3 pour *E. coli* DH5 $\alpha$  et pour la souche issue de la bouse dans le sol sous *Poa* à 48h et 2 microcosmes sur 2 pour la souche issue du sol sous *Poa* dans le *Rumex* à 0h). Le transcrite du gène *dps* est observé dans un plus grand nombre d'échantillons mais au maximum, dans la moitié des échantillons d'une même condition (réplicats d'extraction ou réplicats de microcosmes) (Tableau 17). Si l'on s'intéresse aux rapports d'expression entre le gène *rpoZ* (phase exponentielle) et le gène *rmf* ou *dps* (phase stationnaire), une cohérence de réponse est observée dans certaines situations. Par exemple, pour un même échantillon (*E. coli* DH5 $\alpha$  dans le *Rumex* à 48h), un signal est obtenu soit pour *rpoZ* soit pour *dps* ou *rmf*. Dans d'autres cas, les ADNc de *rpoZ* et de *dps* sont détectés en même temps (e.g. *E. coli* issu de la bouse dans le *Rumex* à 48h et 7j).

#### IV. Discussion

Cette étude avait deux objectifs principaux. Le 1<sup>er</sup> premier consistait à évaluer l'influence de l'origine environnementale des souches d'*E. coli* sur leurs capacités d'adaptation (acclimatation/naturalisation) dans des sols par l'étude des cinétiques de survie de différentes souches d'*E. coli* dans des microcosmes de sols. Le 2<sup>nd</sup> objectif d'ordre méthodologique, devait aboutir à l'élaboration d'outils moléculaires permettant de suivre l'état physiologique d'*E. coli* dans l'environnement. Pour répondre à ce 2<sup>nd</sup> objectif, deux étapes ont été réalisées. La 1<sup>re</sup> a consisté à étudier, la cinétique d'expression des marqueurs d'état physiologique *in vitro*; et la 2<sup>de</sup> a consisté à étudier leurs niveaux d'expression *in situ* dans des microcosmes de sol.

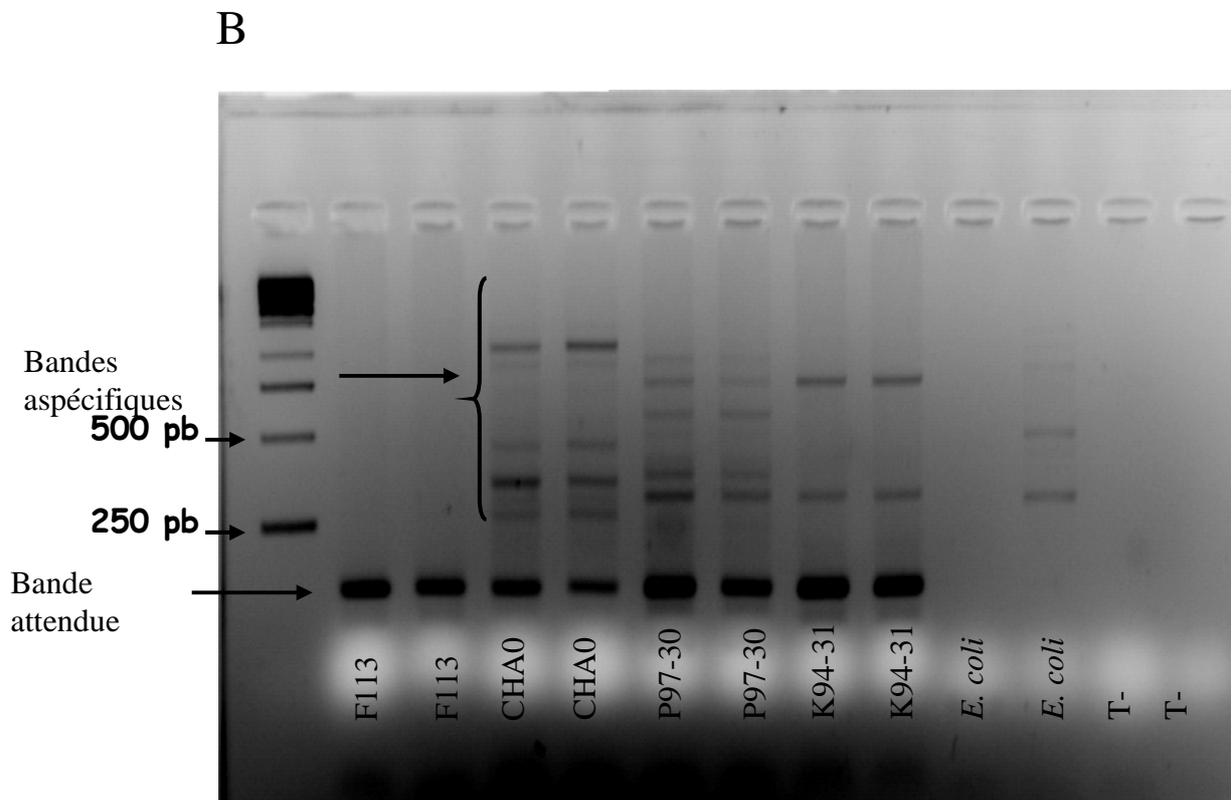
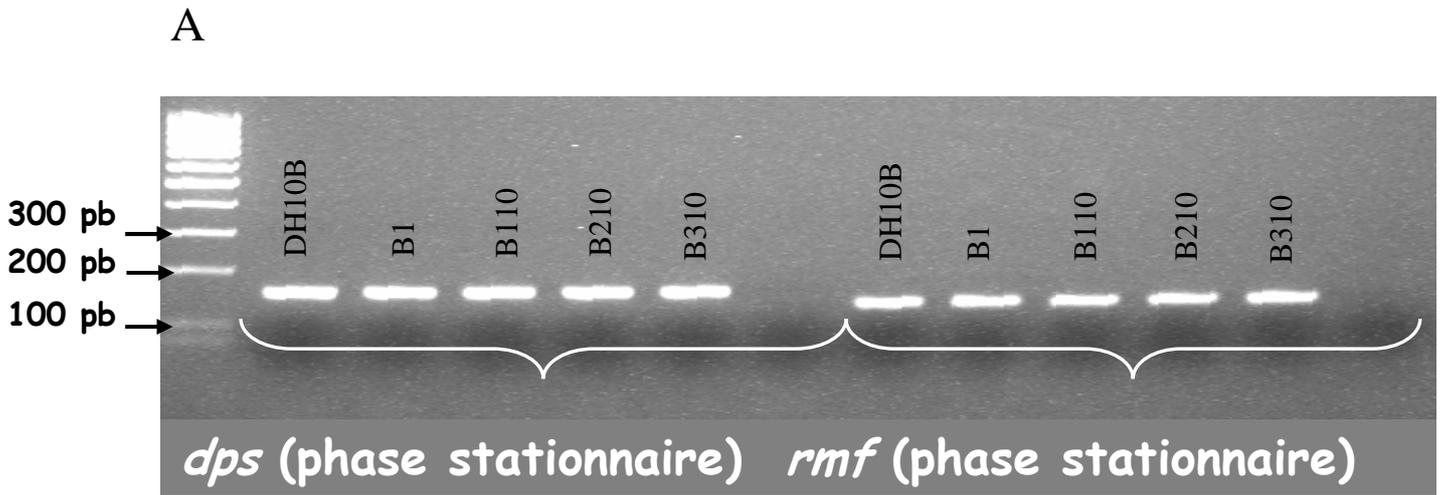


Figure 36 : Exemple de résultats de PCR obtenus pour différentes souches (A) d'*E. coli* pour les gènes *dps* et *rmf* et (B) de *P. fluorescens* pour le gène *ftsZ* (phase exponentielle). Pour (B) une souche d'*E. coli* et de l'eau distillée (T-) sont utilisés comme témoins négatifs

#### IV.1. Cinétique de survie de souches d'*E. coli* d'origine différente dans les sols

Selon leur origine, les quatre souches inoculées ne présentent pas les mêmes capacités de survie dans les deux conditions de sol testées. Scott *et al.* (2006) suggèrent que le passage dans le tractus gastro-intestinal confère à *E. coli* O157:H7 une meilleure capacité de survie dans des milieux oligotrophes. A partir de notre étude, nous pouvons élargir cette observation à des souches environnementales d'*E. coli*. Le sol sous *Poa* apparaît être un milieu plus favorable au maintien des *E. coli* que le sol sous *Rumex*, aux conditions plus stressantes, puisque toutes les souches y survivent plus longtemps. Dans les 5 premiers cm, le sol sous *Poa* présente un taux de carbone organique plus élevé que celui sous *Rumex* (respectivement 85,4 g kg<sup>-1</sup> contre 58,4 g kg<sup>-1</sup>) ce qui pourrait expliquer les différences de comportements observées.

D'une façon générale, la souche de laboratoire (DH5 $\alpha$ ) survit moins bien dans le sol qu'une souche isolée d'une bouse qui, elle-même, se maintient moins durablement que des souches isolées du sol. Par ailleurs, chaque souche isolée d'un sol survit mieux dans son sol d'origine qu'une souche provenant d'un autre sol. Ce classement reflète bien le fait que (i) le passage dans le tractus digestif confère à *E. coli* des propriétés de survie dans le sol, (ii) que le passage dans un sol confère également d'autres propriétés lui permettant de survivre dans un sol, ce, d'autant plus s'il s'agit du sol dont elle a été isolée et (iii) que toutes les souches n'ont pas les mêmes capacités d'adaptation à des stress environnementaux. Ces résultats appuient l'hypothèse formulée dans les travaux relatifs au suivi de la dynamique d'*E. coli* dans les sols (Partie 3) concernant la possibilité d'adaptation de certaines populations d'*E. coli* au sol.

Sur le terrain, des effectifs voisins de 10<sup>4</sup> *E. coli* g<sup>-1</sup> de sol sec ont toujours été détectés dans le sol de surface, quelque soient la pression de pâturage et les conditions climatiques (présence ou non de bouse, manteau neigeux, fonte des neiges... ; voir chapitre 2). Nous avons conclu que les *E. coli* seraient plutôt localisés dans la microporosité du sol. Or, dans certains microcosmes de sol (principalement pour le sol sous *Rumex*), les *E. coli* deviennent indétectables dès 10 jours. Ici, le système poral est fortement altéré par le tamisage. De ce fait, on peut émettre l'hypothèse que les *E. coli* ne sont plus protégés dans la microporosité et donc potentiellement soumis à la prédation par les protozoaires présents dans les sols des microcosmes. Le tamisage a également aéré le sol et de ce fait, altéré ses propriétés physico-chimiques, notamment dans l'essai *Rumex*, où le sol est confiné et saturé en eau dans les conditions naturelles. Cette modification des conditions d'oxygénation pourrait entraîner des

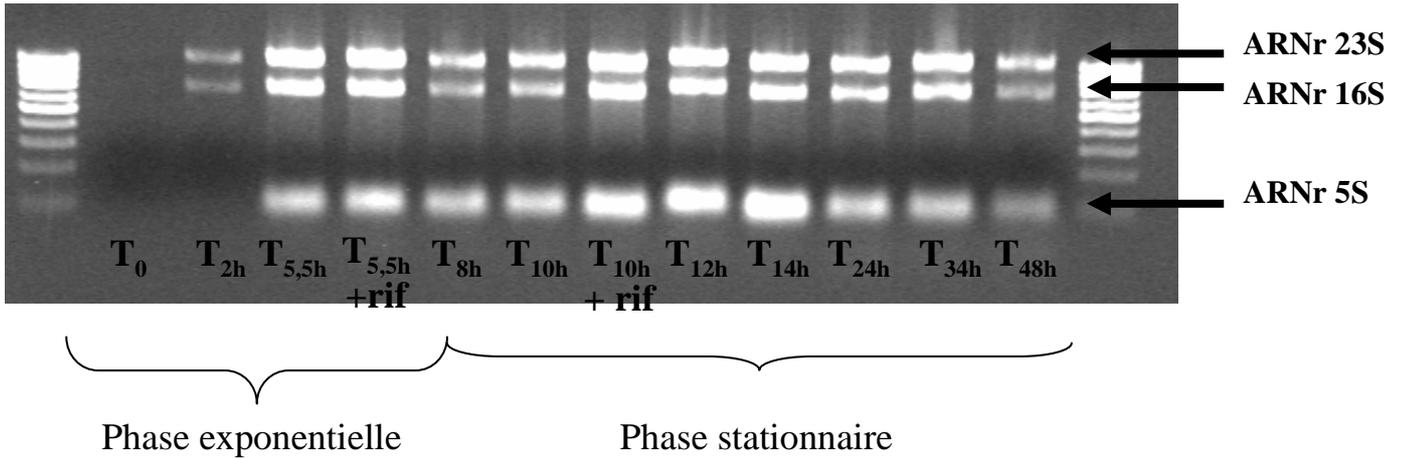


Figure 37 : ARNs extraits sur les cultures à différents stades de la croissance

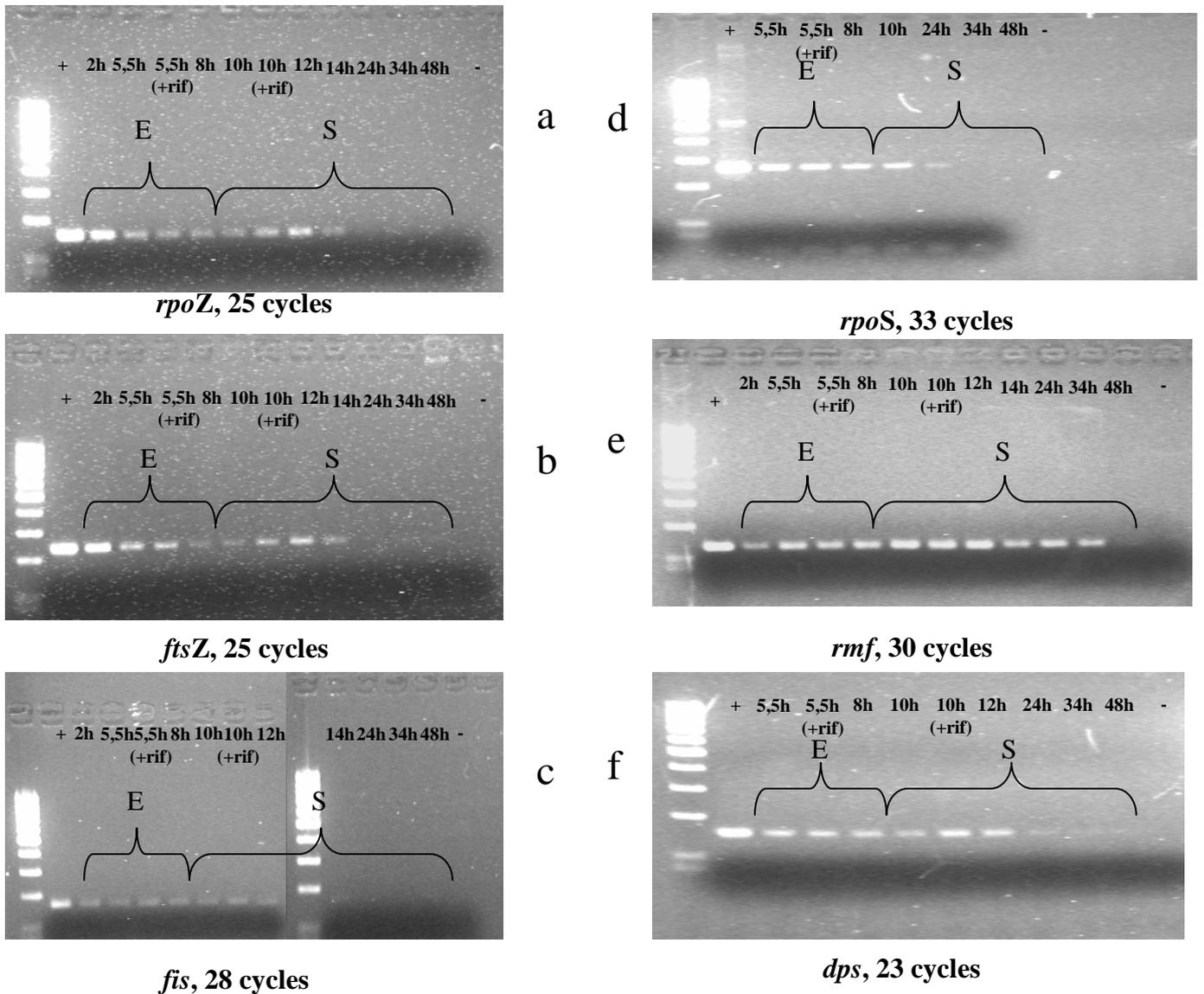


Figure 38 : Exemple de signaux obtenus par RT-PCR semi-quantitative sur les ARNs extraits de la culture d'*E. coli* DH10B aux différents stades de la croissance pour l'ensemble des marqueurs a. *rpoZ*, b. *ftsZ*, c. *fis*, d. *rpoS*, e. *rmf* et f. *dps*. E pour phase exponentielle et S pour phase stationnaire.

réactions d'oxydoréduction affectant la survie des bactéries fécales, expliquant probablement la faible survie des populations dans ce sol. De plus, le sol sous *Rumex* est probablement plus propice pour l'établissement d'une population de protozoaires dense, notamment du fait de l'humidité constante et des fortes teneurs en matière organique, que le sol sous *Poa*. Dans les conditions naturelles (donc sans déstructuration), des niveaux constants de  $10^4$  cellules  $g^{-1}$  de sol ont été observés (chapitre 2). Dans les microcosmes, les comportements observés sont différents. Dans le sol sous *Rumex*, la surprenante non-détection d'*E. coli* pourrait être due à l'effet du tamisage sur les propriétés physicochimiques de ce sol et également aux conditions de milieu plus stressante que dans le sol sous *Poa*. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette non-détection des cellules. Soit les cellules ont périclité, soit elles sont entrées dans un état VBNC. Bogosian *et al.* (1996) ont montré qu'*E. coli* K12 W3110 n'entrait pas en état VBNC après inoculation dans des sols incubés à différentes températures (4 °C, 20 °C et 37 °C). Il serait intéressant de confirmer l'absence d'*E. coli* non cultivables dans les sols étudiés en développant une approche de type DVC-FISH par exemple.

Différents éléments importants ont été mis en évidence dans cette analyse du comportement d'*E. coli* en microcosme: (i) la localisation spatiale des *E. coli* dans la microporosité les protège probablement de toute agression biologique et (ii) les différents biotopes rencontrés et occupés par les souches au cours de leur transfert d'un écosystème à l'autre conditionnent leur aptitude à survivre dans l'environnement. Il est toutefois difficile d'extrapoler les résultats trouvés en microcosmes au terrain, puisque le traitement mécanique des sols altère leur structure et leurs propriétés physico-chimiques. L'utilisation de lysimètres qui ne déstructurent normalement pas le sol pourrait être un bon compromis entre approche de terrain et approche en microcosmes.

#### IV.2. Suivi de l'état physiologique des *E. coli* *in vitro* et *in situ*

En ce qui concerne l'expression des marqueurs moléculaires de l'état physiologique des bactéries, des amorces ont été mises au point afin d'amplifier ces gènes chez *E. coli* et chez *Pseudomonas* spp.. La spécificité de ces amorces a été validée sur des cultures pures d'espèces taxonomiquement proches. Elles doivent cependant encore être validées par séquençage d'amplifiats obtenus à partir d'échantillon d'ADN total du sol.

*In vitro*, l'expression des marqueurs n'a pas tout à fait correspondu à celle décrite dans la littérature. Pour les marqueurs de phase exponentielle de croissance, le transcrit du gène *ftsZ* a eu détecté tout au long de la phase exponentielle de croissance et en début de phase

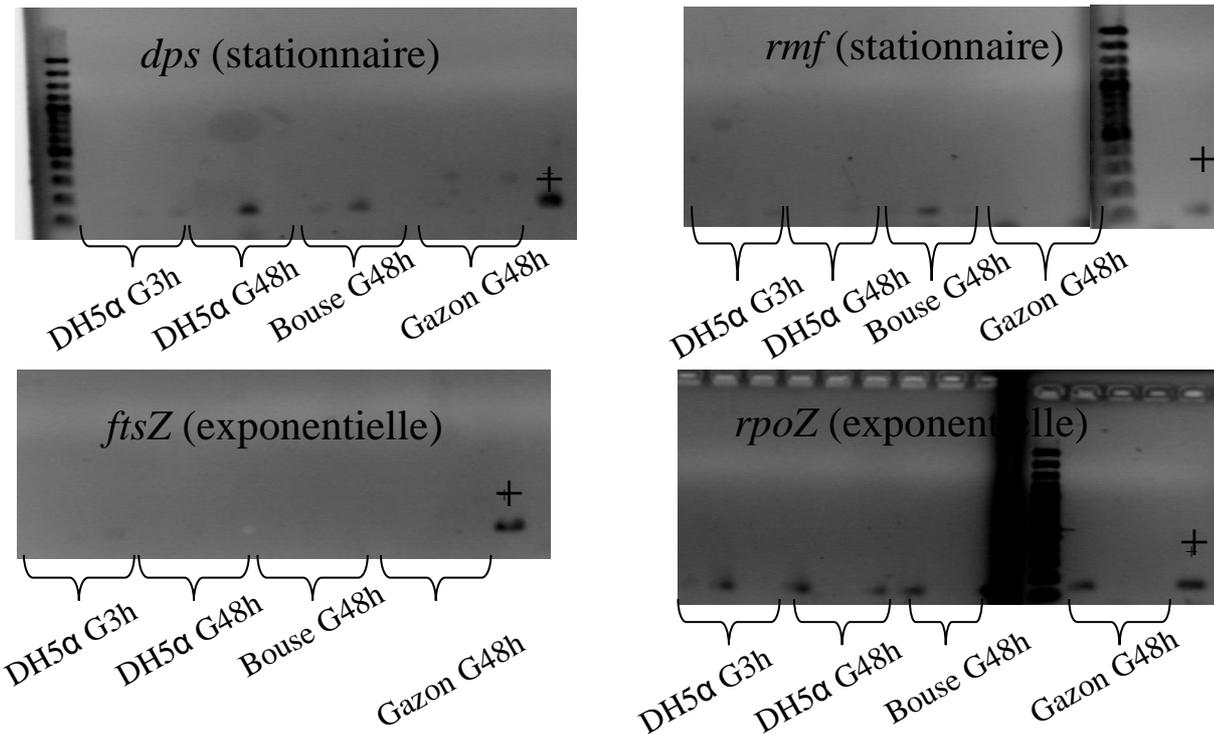


Figure 39 : Exemple des résultats des PCR obtenus dans les microcosmes de *Poa* avec la souche DH5α, la souche issue de la bouse et celle issue du sol sous *Poa*, à 3h et 48h d'incubation, pour les marqueurs *dps*, *rmf*, *ftsZ* et *rpoZ*. + pour le témoin positif.

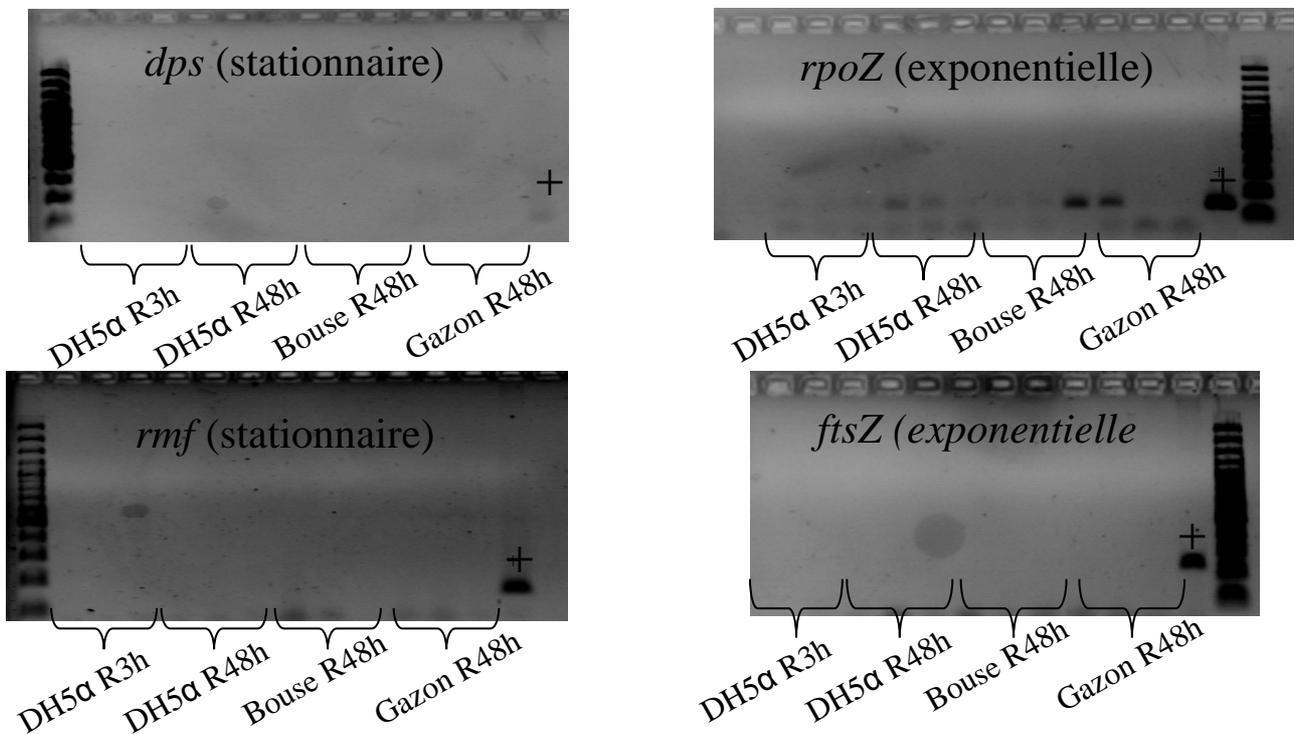


Figure 40 : Exemple des résultats des PCR obtenus dans les microcosmes de *Rumex* avec les souches DH5α, issue d'une bouse et du sol sous *Poa*, à 3h et 48h d'incubation, pour les marqueurs *dps*, *rmf*, *ftsZ* et *rpoZ*. + pour le témoin positif.

stationnaire. Or, sa transcription est corrélée à la réplication du chromosome et est cyclique au cours de la division cellulaire. Une fluctuation du niveau de transcrits était donc attendue. Cependant, vu le pas de temps de l'expérimentation, cette fluctuation n'a peut-être pas pu être visualisée. Il est donc probable que toutes les cellules de la culture ne soient pas synchrones et présentent des cycles de réplication déphasés. L'entrée en phase stationnaire n'est pas forcément coordonnée pour l'ensemble des cellules d'une culture, ce qui pourrait expliquer l'expression observée en début de phase stationnaire. Pour le gène *fis*, d'après Chen *et al.* (2004), un pic de concentration de transcrit doit être observé dans les toutes 1<sup>res</sup> heures de la croissance, ce qui n'a pas été le cas dans nos conditions expérimentales. Enfin, le gène *rpoZ* a répondu comme décrit dans la littérature par Travers et Muskhelishvili (2005) puisque le signal était plus fort au début de la cinétique de croissance qu'à la fin.

Pour les marqueurs de la phase stationnaire de croissance, on n'a pas pu rendre compte d'un pic de concentration du transcrit du gène *dps* en début de phase stationnaire, comme cela a été observé par Chen *et al.* (2004). Pour le gène *rpoS*, une expression a été observée aussi bien en phase exponentielle qu'en phase stationnaire, sans toutefois mettre en évidence de réelles différences d'intensité de signal entre les différents échantillons. Dans la littérature, on peut relever des résultats contradictoires en ce qui concerne la régulation de l'expression de ce marqueur selon la phase de croissance. Selon les auteurs, l'expression du gène *rpoS* serait régulée à un niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel (Venturi, 2003 ; Zgurskaya *et al.*, 1997 ; Lange & Hengge-Aronis, 1991). Nos résultats suggèrent l'absence de régulation transcriptionnelle du gène *rpoS* en fonction de la phase de croissance dans les conditions testées. Ce marqueur a donc été écarté dans les expérimentations en microcosmes de sol. Enfin, *rmf* a répondu comme décrit dans la littérature puisque la quantité de transcrit a commencé à augmenter en fin de phase exponentielle et était maximale en début de phase stationnaire.

*rpoZ* et *rmf* semblent donc être de bons candidats pour évaluer l'état physiologique d'*E. coli*. Toutefois, ces conclusions concernent des évolutions en milieu de culture complet, qui s'écartent des conditions rencontrées par les bactéries dans le sol. Nous avons donc tenté de valider l'utilisation de ces marqueurs *in situ*.

*In situ* dans les microcosmes de sol, une absence de réponse a souvent été observée. Les ARNs extraits du sol étant de bonne qualité (Figure 41), ces non-détections des marqueurs peuvent provenir d'une trop forte dilution des cibles en raison d'effectifs en *E. coli* ou de niveaux de transcription des gènes trop faibles.



Une grande variabilité inter- et intra-microcosme a été observée, rendant difficile l'interprétation des résultats en ce qui concerne la détermination de l'état physiologique d'*E. coli* dans le sol. La plus grande variabilité inter-microcosme dans le sol sous *Poa* par rapport au sol sous *Rumex* peut s'expliquer par la nature du sol. Le sol sous *Poa* est riche en matière organique décomposée, notamment en acides humiques, et cette richesse en composés humiques est connue pour affecter les extractions d'acides nucléiques et gêner par la suite les amplifications par PCR (Yeates *et al.*, 1998). La forte variabilité intra-microcosme observée dans le sol sous *Rumex* suggère que l'extraction d'ARNm sur 500 mg de sol ne permet pas d'obtenir une bonne représentativité du microcosme. Le sol sous *Rumex* est riche en argile (60 %, voir Tableau 11). Suite à l'inoculation des souches bactériennes, des agrégats peuvent se former entre particules d'argile et bactéries et ainsi conduire à un état physiologique particulier des bactéries agrégées et à la variabilité de réponses observée. Ce biais n'existe pas pour l'étude des dynamiques des populations d'*E. coli* dans les sols (Chapitre 2) puisque les énumérations y sont réalisées à partir de volumes d'échantillons plus importants (environ 1,5 g). Des extractions sur 1,5 g de sol ou la réalisation d'un échantillon moyen à partir de 3 extractions indépendantes sur 500 mg pourraient limiter cette variabilité de réponses.

Le gène *ftsZ* n'a été détecté qu'une fois, lors de la phase de division observée dans les microcosmes de sol inoculés avec des populations indigènes de bouse, reflétant une expression transitoire, relatée dans la littérature (Garrido *et al.*, 1993). De la même façon, le gène *fis* est connu pour être transcrit de façon transitoire (Azam *et al.*, 1999), expliquant sa non détection. Des fenêtres d'expression trop restreintes rendent ces deux gènes difficilement utilisables comme marqueurs moléculaires de la division. Cette non-détection des gènes *ftsZ* et *fis*, spécifiquement exprimés au cours de la phase exponentielle de croissance, n'était donc pas surprenante. Enfin, pour le gène *rpoZ*, sa transcription est décrite comme maximale en début de phase exponentielle puis nulle en phase stationnaire. Cependant, *rpoZ* est aussi impliqué dans la réponse stringente *in vitro* (Igarashi *et al.*, 1989). Le gène *rpoZ* est le marqueur le plus détecté, notamment dans les microcosmes de *Rumex*, alors qu'aucune phase exponentielle n'a été observée, à part dans les microcosmes où les populations indigènes d'une bouse ont été inoculées. Dans cette étude, l'accumulation des transcrits du gène *rpoZ* pourrait donc être liée à une réponse aux stress et non à la division des cellules. On peut également supposer que cette fréquente détection de l'ADNc du gène *rpoZ* n'est pas liée à un plus fort taux de sa transcription mais à une augmentation de la stabilité de son ARNm sous l'effet du stress. Cette régulation post-transcriptionnelle a déjà été décrite pour d'autres

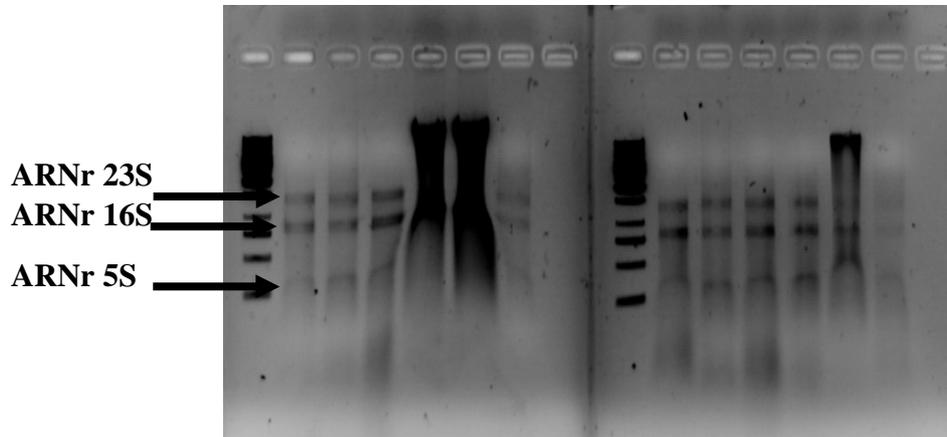


Figure 41 : Visualisation d'ARN extraits du sol. Une variabilité entre échantillons est observable en ce qui concerne l'élimination de l'ADN et des acides humiques. Par exemple, les échantillons 4, 5 et 11 présentent des résidus d'ADN ou d'acides humiques

facteurs impliqués dans la régulation de la transcription génique au cours de la croissance bactérienne (par exemple, pour *rpoS*, Venturi, 2003).

Les essais réalisés sur l'expression des marqueurs d'état physiologique montrent qu'une calibration de la méthode est encore nécessaire, notamment pour les marqueurs *rpoZ*, *dps* et *rmf* qui présentent, dans certains microcosmes, des réponses cohérentes (expression soit du marqueur de division soit du marqueur de phase stationnaire). Une suggestion serait de réaliser une rétrotranscription spécifique de chaque gène et non aléatoire comme cela a été fait au cours de ce travail. Une rétrotranscription aléatoire conduit à la synthèse d'ADNc à partir de l'ensemble des ARNs présents dans l'échantillon. De ce fait, les ARNs d'*E. coli*, minoritaires (du fait des faibles niveaux de populations), se retrouvent dilués au sein des ARNs de la communauté microbienne totale du sol ce qui rend difficile l'accès à la cible. Une RT-PCR spécifique permettrait d'amplifier spécifiquement le gène marqueur recherché, stratégie plus efficace mais écartée dans un 1<sup>er</sup> temps de part sa lourdeur lorsque plusieurs gènes doivent être considérés en parallèle.

Par ailleurs, les niveaux de transcrits des marqueurs chez les *Pseudomonas* spp. doivent être étudiés. Une fois le protocole mis au point et validé pour l'ensemble des populations étudiées (notamment, après avoir vérifié par séquençage l'identité des amplifiats obtenus à partir du sol), des rapports d'expression entre les différents marqueurs devraient être analysés afin d'établir si les populations bactériennes indigènes et introduites sont plutôt en état de division ou en état de dormance. La comparaison des rapports d'expression des marqueurs chez *E. coli* et chez *Pseudomonas* spp. devrait également permettre de savoir si ces deux populations présentent ou non le même état physiologique.



**Chapitre 4 :**  
**Structure génétique des populations d'*E. coli* dans**  
**les différents compartiments du Bassin Versant de**  
**l'Alpage de Bise**



#### Avant-propos chapitre 4

Suite aux chapitres 2 et 3, nous savons que la rhizosphère constitue un réservoir environnemental permanent en *E. coli* et que l'origine des souches est un facteur influençant leur viabilité dans le sol. De plus, des relations entre circulation d'*E. coli* dans le sol et fonctionnement hydrologique des sols ont été soulignées à partir des travaux réalisés sur le dénombrement des populations cultivables d'*E. coli* dans les sols de l'alpage de Bise (chapitre 2).

Ce dernier chapitre a pour but d'étudier la structure des populations d'*E. coli* dans les différents compartiments du bassin versant: dans les bouses (entrées des bactéries fécales), dans le réservoir constitué par les différents sols et dans l'eau à l'exutoire (sorties des bactéries fécales) de façon à obtenir des informations sur le fonctionnement du système étudié et confirmer les hypothèses élaborées à l'issue de l'étude de la dynamique des populations d'*E. coli* dans les sols (chapitre 2), à savoir :

- dans les sols drainants tels que le sol sous *Poa*, les populations d'*E. coli* proviendraient principalement des bouses présentes en surface.

- dans le sol de la station *Rumex*/réduit, vu la stabilité des effectifs bactériens et les conditions d'hydromorphie présentes, les populations seraient très peu soumises à l'influence des bouses et seraient constituées en grande partie de populations naturalisées au sol.

- dans le sol de la station *Rumex*/oxydé, où la circulation de l'eau est limitée les populations d'*E. coli* seraient également plutôt constituées de populations naturalisées au sol et seraient peu influencées par la présence de la bouse en surface.

L'étude de la structure des populations dans l'eau pourrait déterminer les sources principales de contamination du cours d'eau, les éventuels réservoirs mobilisés lors d'épisodes pluvieux et ainsi, permettre de mieux appréhender le fonctionnement global du bassin versant étudié.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article unique, qui devrait être soumis à *Environmental Microbiology*, exposant les résultats obtenus suite à l'étude de la structure des populations d'*E. coli* dans les différents compartiments du bassin versant, par PCR-DGGE ciblant le gène *uidA* (voir synthèse bibliographique). L'approche choisie est une approche populationnelle et non individuelle (approche plus classiquement utilisée pour les études de diversité des populations d'*E. coli*) permettant d'accéder à l'ensemble des populations cultivables présentes, tant majoritaires que minoritaires.



Brièvement, les résultats obtenus confirment l'hypothèse de naturalisation de certaines populations d'*E. coli*. Ils confirment également la corrélation existant entre fonctionnement hydrologique des sols et circulation des *E. coli* issus des bouses dans le sol. De plus, l'étude de la diversité par approche populationnelle a permis de mettre en évidence que les principales sources de contamination de la rivière sont principalement les bouses, et de façon plausible les sols drainants.



**Structure génétique des populations d'*E. coli* dans les différents  
compartiments du Bassin Versant de l'Alpage de Bise**

**Patterns of naturalized *E. coli* in pastured watershed and consequences on water quality by assessing the genetic structure of natural *E. coli* populations by *uidA* PCR-DGGE**

S. Texier<sup>1,2</sup>, L. Jocteur-Monrozier<sup>1</sup>, M.-A. Poirier<sup>1</sup>, P. Faivre<sup>2</sup>, D. Trevisan<sup>2</sup>, Y. Moënne-Loccoz<sup>1</sup>, C. Prigent-Combaret<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Lyon, Lyon F-69003, France ; Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France ; UMR CNRS 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F-69622, France ; IFR 41, Villeurbanne, F-69622, France

<sup>2</sup> UMR CARTELE, INRA, Université de Savoie, 74203 Thonon-les-Bains cedex, France

\*Corresponding author: Phone: +33 (0) 4 72 44 58 89 - Fax: +33 (0) 4 72 43 12 23

E-mail: [prigent@biomserv.univ-lyon1.fr](mailto:prigent@biomserv.univ-lyon1.fr)



## ABSTRACT

*Escherichia coli* populations were compared by *uidA* PCR-DGGE in a dairy alpine watershed to determine whether water contamination is due preferentially to cow pat inputs or dissemination of possible naturalized soil populations. Clustering analysis of DGGE fingerprints obtained throughout the pasture season from cow pats, topsoil (0-5 cm), subsoil (5-25 cm) and the watershed creek revealed that all *uidA* alleles from cow pats were also found in soil of highly-grazed pastures, in accordance with transfer of fecal *E. coli* into soil. In contrast, the soil in poorly-grazed pastures displayed a singular, steady *E. coli* population structure, distant from those of cow pats and highly-grazed pastures. This points to the occurrence of naturalized soil populations of *E. coli* in poorly-grazed pasture, which were also evidenced in highly-grazed soils but more scarcely. All *uidA* alleles retrieved from water were recovered from cow pats and from either poorly or highly-grazed soils, which all displayed additional alleles. *uidA* fingerprints from water were close to those from cow pats and well-drained soils but contaminated by recent cow pat inputs. Overall, this study substantiates the hypothesis of the occurrence of soil-adapted *E. coli* populations in pasture soils, but water contamination of the watershed stream seems mainly due to recent arrivals of *E. coli* populations via cow pats.



## I. Introduction

Soil influences water quality by several ways: run-off, transfer and transport of solutes, of suspended materials and of microorganisms. In the context of health risk assessment, the fate of total coliforms and more precisely *E. coli* from soil to water deserves attention because their presence involves a poor water quality related to a potential presence of human pathogens (Greenberg *et al.*, 1992). The environmental compartments that have been most often studied were the dejections (inputs) or water (output) whereas the soil is underestimated as it is considered as a black box. To address the particular role of soil in microbial water contamination will represent a major challenge. Beside the potential presence of human pathogens, previous studies evidenced the occurrence of soil naturalized and resident *E. coli* populations in tropical (Byappanahalli & Fujioka, 1998) as well as in temperate environments (Texier *et al.*, *in press*, Byappanahalli *et al.*, 2006, Ishii *et al.*, 2006). In a previous study, the survival of *E. coli* in alpine pastures was studied (Texier *et al.*, *in press*). Steady levels ( $10^3$  to  $10^4$  cells  $g^{-1}$ ) of *E. coli* were detected in topsoil layers (rhizosphere) whatever the the absence/presence of cow pats, the meteorological conditions, the pasture type and the sampling date. Therefore, the one and only numeration of *E. coli* in soil could not provide an accurate assessment of current fecal contaminations. A proper evaluation of the contamination should differentiate the recent fecal populations originated from animal dejection from the environmental resident populations. For pastoral conditions, the diversity of *E. coli* populations needs first to be better investigated with a global approach in space and time of the functioning of the system linking the deposition and evolution of cow pats, the subsequent introduction of fecal micro-organisms in soils environment and their fate and transfer to the various water bodies of the watersheds. The objectives of this work is : (i) assess the patterns of the naturalization of *E. coli* in soils ; (ii) identify whether naturalized soils should participated to the bacterial contamination of watershed waters.

Previous studies described *E. coli* diversity in animal dejections and in intestinal tract according to the host species, their diets and their life-style (Hartel *et al.*, 2003, Cray *et al.*, 1998, Aslam *et al.*, 2003, Bettelheim *et al.*, 2005, Jarvis *et al.*, 2000, McLellan *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2004). Firstly, a high variability has been reported among animal species but also according to the age of the animal without any concrete explanation (Aslam *et al.*, 2003). Secondly, diet is known to affect diversity. For example, Hartel *et al.* (2003) show higher *E. coli* diversity in wild deer than in penned deer. In water, studies deal principally with the *E.*



*E. coli* source tracking (*i.e.* tracking the animal origin of *E. coli* retrieved from water). These studies relied on isolate approach and used various techniques to characterize populations, such as antibioresistance patterns (Souza *et al.*, 1999, Parveen *et al.*, 1997), ribotyping (Hartel *et al.*, 2003), Pulse Field Gradient Electrophoresis (PFGE ; Jarvis *et al.*, 2000) or MultiLocus Enzyme Electrophoresis (MLEE ; Pupo *et al.*, 2000, Souza *et al.*, 1999). Microarrays have been also designed to track the source of fecal contaminants. They screen chiefly virulence factors of pathogenic *E. coli* strains such as *eae*, *stx* genes together with housekeeping genes (Bekal *et al.*, 2003). Based on isolates, these methods are time-consuming, fastidious, and expensive. Even with a high number of isolates, it remains difficult to assess the whole bacterial diversity due to the dominant populations which hinder the detection of less numerous populations. Global approaches either on culturable or unculturable populations allow to overcome this difficulty. (Farnleitner *et al.*, 2001) investigated *E. coli* diversity in water using the polymorphism of the *uidA* gene which encodes the  $\beta$ -D-Glucuronidase. Even if all *E. coli* strains do not possess this activity (*i.e.* pathogenic strains of *E. coli* O157:H7 serogroup), the *uidA* gene remains detectable by PCR in 98 % of *E. coli* strains (Martins *et al.*, 1993). In pristine tropical soils, Lasalde *et al.* (2005) used *uidA* PCR-DGGE to study the diversity of *E. coli* isolates. Considering the high spatial and temporal diversity observed on *E. coli* isolates, the authors concluded that a strain approach enabled to carry out source tracking. (Sigler & Pasutti, 2006) assessed the diversity of mixed *E. coli* populations in sediment and in water using *uidA* PCR-DGGE and compared it to diversity observed by BOX-PCR. At the strain level, BOX-PCR had an expected higher resolution than *uidA* PCR-DGGE as different parts of the genome is taken into account for BOX-PCR analysis compared to only one gene for DGGE analysis. Nonetheless, at mixed population level, DGGE on *uidA* was evaluated as an efficient tool to differentiate *E. coli* populations in secondary habitats (*e.g.* sediments).

*E. coli* diversity was investigated by a population approach using *uidA* PCR-DGGE in the different compartments of a pastured watershed: in the dejections of dairy livestock (source); in different soils at different depths (rhizosphere and subsoil) and at the water discharge (output).



## II. Materials and methods

### II.1. Site description.

Field investigations were performed on a watershed of 4 km<sup>2</sup> located in the summer mountain pasture of Bise (French Alps, Haute-Savoie), at an altitude between 1500 and 2000 m. In the first part of the 20<sup>th</sup> century, around 350 cows used to migrate on the Bise watershed. The exploitation has diminished in the 1950's and currently, only 80 dairy cows graze on this area from mid June to mid September.

Four sampling sites (< 1 ha) were retained. They correspond to different types of pasture units, with different ecological attributes such as specific soil functioning and dominant plant species. These four pasture units have been described in details in Texier *et al.* (*in press*). Briefly, the *Poa* grassland presents a mesotrophic vegetation rich in clover (*Trifolium repens*). The soil is a haplic cambisol (FAO, 2006). It is characterized by a very high macroporosity and permeability ( $K = 127 \text{ mm h}^{-1}$ ). The *Rumex* grassland is developed on an umbrisol (FAO, 2006). This area receives frequent cow pat inputs, which favors nitrophilic species such as *Rumex alpina*. In subsoil, two types of hydromorphic traits are observed depending on location within the unit. First, reduced and saturated subsoil is found; this subsoil is termed *Rumex/reduced*. Secondly, oxidized subsoil is found with lateral circulation of water and toxic aluminous ions; this subsoil is termed *Rumex/oxidized* subsoil. The *Caltha* grassland (dominated by *Caltha palustris*) is developed on a histic leptosol (FAO, 2006) and the *Nardus* grassland (dominated by *Nardus stricta*) is on an entic podzol (FAO, 2006).

The discharge of the watershed has been monitored during one pasture season. Water *E. coli* levels varied from undetectable levels (<1 cells 100 mL<sup>-1</sup>) outside the pasture season to low levels (around 20 cells 100 mL<sup>-1</sup>) during low water flow and high levels (up to 3500 cells 100 mL<sup>-1</sup>) during flood periods (data not shown).

### II.2. Sampling of soils, cow pats, cattle feces and wild fauna excrements

Soil samples were collected according to Texier *et al.* (*in press*). Briefly, four fresh cow pats (2 days old at the most) were selected at the beginning of the sampling period on *Poa* and four on *Rumex* grasslands, and associated soil samples were subsequently collected monthly from June until October 2006. Soil samples associated to cow pat were collected immediately under cow pats, in the layers 0-5 cm ("topsoil") and 5-25 cm ("subsoil") and, 1 m downhill from the cow pats in both soil layers ("downhill topsoil" and "downhill



subsoil”). In addition, 8 downhill topsoil samples were collected in August 2006 in the four pasture units *Poa*, *Rumex*, *Caltha* and *Nardus*. Soil samples were cored horizontally with an ethanol-treated clean auger (5 cm in diameter × 20 cm long) from a 20 cm-wide trench. For each soil sample, three 50-cm<sup>3</sup> soil cores were mixed together in sterile plastic bags. Soils were stored at 4 °C overnight before analysis.

During the sampling period, cow pats were collected twice throughout their decomposition: at the beginning when they were fresh and 30 days later, when they were dried. Cow pat material (100 cm<sup>3</sup> per pat) was collected with clean gloves and stored in sterile bags at 4 °C before analysis. Cattle feces were also collected directly, by a veterinary, in rectum of 4 cows in July 2006.

Wild fauna excrements (1 fox, 2 ibex, and 3 marmots) were also sampled once in summer 2006 with clean gloves and were stored directly at -20 °C until direct DNA extraction.

### II.3. Water samples: sampling and treatments

Water samples were collected weekly at the discharge of the watershed during the pasture season in sterile vials, either during low water flow (7 samples) or flood periods (3 samples). Water was aseptically filtered on 0.45 µm HA membrane filters (Millipore, Molsheim, France) and the filters were either stored at -20 °C until direct DNA extraction as described by (Favre-Bonte *et al.*, 2005) either deposited on TTC-tergitol7 agar and incubated overnight at 44 °C. Following incubation at 44 °C, presumptive water *E. coli* isolates (yellow-brown colonies) were restreaked onto modified Luria Bertani (LB) medium (Bertani, 1951) to generate pure isolates. Isolates were confirmed as *E. coli* by PCR *uidA* according to (Bej *et al.*, 1991).

To compare the two selective medium used in this study, six identical water samples of 500 mL were filtered on 0.45 µm Millipore filters and 3 filters were deposited either onto MUG-Ec or onto TTC-Tergitol7 agar and incubated overnight at 44 °C. Filters were then washed with PBS and DNA was extracted using the Macherey-Nagel tissue kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerdt, France).



#### II.4. DNA extraction from *E. coli* enriched cultures of soil and cow pat samples

Each sample (25 g of fresh soil or cow pat) was blended (Waring-Blender) in 50 mL of phosphate buffer (pH 6.9). Serial dilutions of the first suspension were done in sterile water. Two hundred microliters of each dilution were added to dehydrated MU/Ec medium (Hernandez *et al.*, 1991) in 16 wells of 96-wells microplates. After 36-72 h at 44 °C, positive blue fluorescent cultures under UV illumination (365 nm) corresponding to the first dilution of samples (in order to keep diversity of culturable *E. coli* populations) were used to inoculate LB broth. After an overnight growth at 37 °C, DNA from mixed cultures was extracted using the Macherey-Nagel tissue kit, according to the manufacturer's instructions. DNA elution was performed with 100 µL sterile H<sub>2</sub>O. These cultures, containing presumptive soil and cow pat *E. coli*, were also spreaded onto modified LB medium to generate pure isolates. 6 isolates were confirmed as *E. coli* by API 20ESystem strips (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France).

#### II.5. Direct DNA extraction from cattle feces and wild-fauna excrements

DNA was directly extracted from 500 mg wet of 6 pats (30 day-old). Wild fauna excrements were collected from ibex, fox and marmots. For each animal, excrements were pooled and separated in triplicate for subsequent DNA extraction by using MOBIO PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA). Cells were lysed in lysis buffer with beads by vortexing at the highest speed during 5 min as recommended by the manufacturer.

#### II.6. Polymerase chain-reaction (PCR)-DGGE of *E. coli uidA* gene.

PCR on *uidA* gene (0.166 kb) was performed with primers UAL-1939 and UAR-2105 as described by Bej *et al.* (1991) with 35 cycles and 50 ng of extracted DNA from mixed culture. A GC-clamp of 40-bp (Muyzer *et al.*, 1993) was attached to the 5' end of primers UAL-1939 to facilitate the separation of PCR product in subsequent denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). DGGE was performed using the Ingeny PhorU 2×2 apparatus (GRI Molecular Biology, Essex, UK) according to a modified protocol of Farnleitner *et al.* (2000). Samples (around 600 ng) were loaded onto 8% polyacrylamide/bis (37.5:1) gels castled using a denaturant gradient ranging from 50% to 62% of denaturants (100% denaturants corresponds to 7M urea and 40% (v/v) deionized formamide). DGGE gel electrophoresis was performed at 100V, 60°C, in TAE 1X buffer (Tris-acetate-EDTA) during 16h. The gels were



stained for 25 min with a 1:10000 dilution of VistraGreen nucleic acid stain (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) and visualized with a UV trans-illuminator.

#### II.7. DGGE fingerprints analyses

All DGGE fingerprints were analysed with GelCompar II v3.00 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). To take into account the deformation of denaturated gels, the same ladder was used for all gels and normalization according to its DGGE fingerprint was performed to allow gel comparison. Results were treated by taking into account the number of DGGE bands per fingerprints and their relative intensity.

#### II.8. Sequencing of *uidA* from DGGE bands and *E. coli* isolates

Sequencing of *uidA* (166 pb) was performed for (i) 57 isolates from water, (ii) 3 isolates from soil layers under *Poa* grassland, 1 isolate from downhill topsoil under *Nardus* grassland and 1 isolate from downhill topsoil under *Caltha* grassland (iii) 1 isolate from cow pats. Additionally, the sequencing of *uidA* was performed for 9 clones from soil under *Poa* grassland, 12 clones from soils under *Rumex*/oxidized grassland and 9 clones from cow pat deposited on *Rumex*/oxidized grassland, as well as DGGE bands from mixed enriched cultures of soil sample. In the latter case, bands of interest (15) were carefully excised from the DGGE gel with a razor blade under UV illumination, and then placed into 100  $\mu$ l sterile water. DNA was extracted from the gel piece by overnight incubation at 4°C. Then supernatant (5  $\mu$ l) was used as template DNA for PCR amplification using UAL-1939 and UAR-2105 primers (Bej *et al.*, 1991) as described above. Thereafter, the amplicon were purified with NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel) and directly sequenced in both senses by Genome Express (Meylan, France).

#### II.9. Phylogenetic analysis of *uidA* alleles encountered in the watershed

Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2001). The distance-based tree was built using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987) and the Kimura-2-parameter model. Nodal robustness of the tree was assessed using 1000 bootstrap replicates. Only nodes with more than 40% bootstrap iterations are represented.

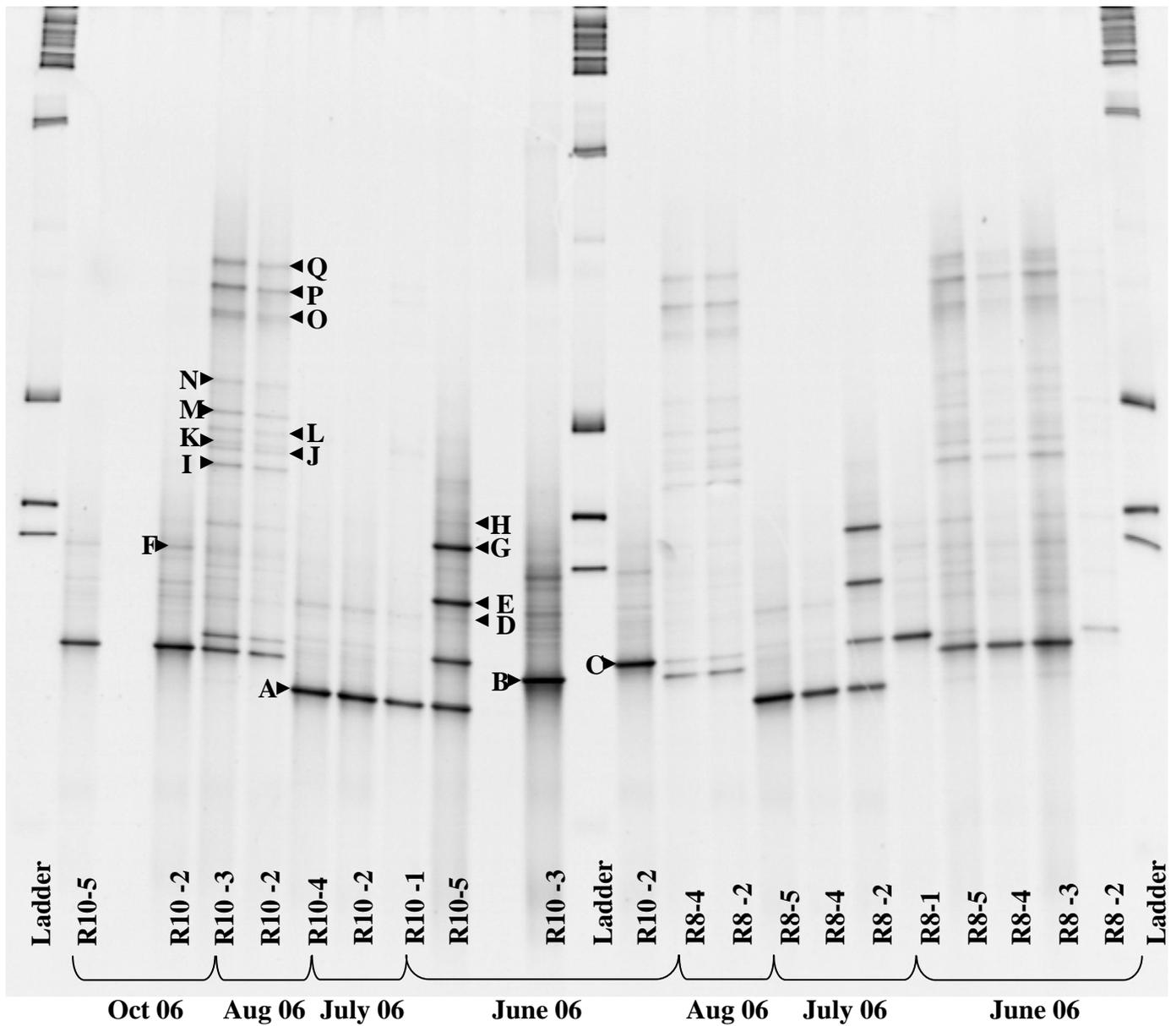


Figure 42 : DGGE gel obtained from *uidA* PCR on *Rumex/oxidized* soil samples. R10-1 and R8-1 corresponded to samples taken in two different cow pats deposited on *Rumex/oxidized* grassland ; R10-2 R8-2 in topsoil under cow pat ; R10-3 and R8-3 in subsoil under cow pat ; R10-4 and R8-4 in topsoil downhill cow pat ; R10-5 and R8-5 in subsoil downhill cow pat. Letters beside DGGE bands indicate the name given to bands for subsequent analyses.

## II.10. Statistical analyses

ADE-4 software (<http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/>) was used to cluster the data of relative intensity of DGGE bands. Euclidean distance was first computed and then, hierarchy was computed with UPGMA method. Dendrograms were drawn using the computed hierarchy.

## II.11. Inoculation experiments

Inoculation experiments were performed to analyse the survival capacity of strains, which were isolated from different environments and, supporting either different *uidA* alleles or the same *uidA* alleles.

### II.11.1. Preparation of cells

Three strains of *E. coli* were isolated either from cow pat or in soil under *Poa* and *Rumex* grasslands on MUG-Ec agar. The 3 strains were confirmed as *E. coli* by growth on TTC-tergitol7 agar at 44 °C and by using API 20ESystem strips. Each strain was grown on LB broth. After overnight growth at 37 °C, optical density (OD<sub>600</sub>) was measured on cultures and these latter were centrifugated at 5500 g for 20 minutes at room temperature. Then, after removing supernatant, pellets were washed twice with 5 mL NaCl 0.8 % and resuspended in PBS (Phosphate Buffer Saline) to obtain a concentration of 10<sup>8</sup> cells per mL (1 OD unit).

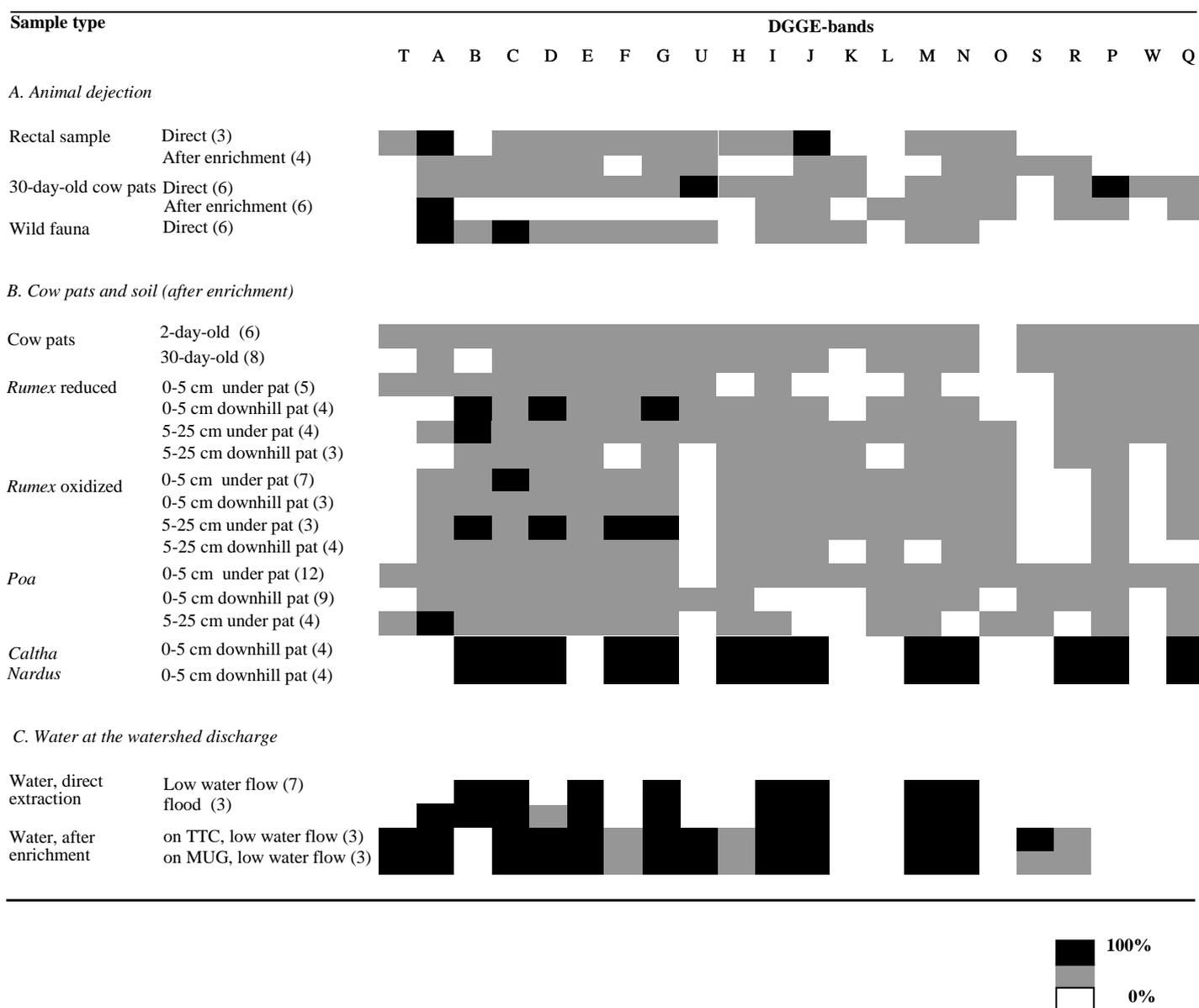
### II.11.2. Preparation of microcosms

The soils were collected in topsoil downhill cow pat under *Poa* and *Rumex* grasslands and sieved at 2 mm. Soil microcosms (10 g) were prepared in triplicate for each soil, strain and date (6 dates). Overall, 108 microcosms were carried out. Each microcosm was inoculated with 5. 10<sup>8</sup> *E. coli* cells. Then, microcosms were alternatively incubated at room temperature (12h) and at 4 °C (12h) for 0h, 7 days, 10 days, 14 days, 28 days and 60 days.

### II.11.3. Enumeration of *E. coli*

At each sampling date, around 1.5 g of soil were sterilely collected and diluted in 9 mL PBS. After vortexing at high speed for 30 s, 0.1 mL was collected and serially diluted in

Table 18 : Occurrence of each DGGE band types found in animal dejections (A and B), soil samples (B) and in water (C). Direct stands for direct DNA extraction without any culture step and after enrichment for DNA extraction after culture steps. In white are represented bands never found; in black, bands always found and in grey, bands found sometimes. In A, the comparison between extraction methods was carried out on rectal samples and 30-day-old cow pats. For this comparison, only 6 cow pats were analysed vs. 8 cow pats in B. Then, bands observed were not necessarily the same between A and B analyses.



0.9 mL of PBS. For each sample, 10 µl of four serial dilutions were inoculated on TTC-tergitol7 agar. After overnight growth at 44°C, cells were counted. Results are expressed as mean cells ( $\pm$  s.e.) per g dry soil.

### III. Results

III.1. Population density and genetic relatedness of *E. coli* populations collected in the Bise watershed.

Overall, more than 20 different *uidA* fingerprints were obtained, each containing between 1 and 15 bands with 22 different DGGE bands (e.g. Figure 42) on the whole *uidA* DGGE fingerprints (Table 18) and 8 (“B” to “I”) appearing on most of fingerprints. We checked that one DGGE band corresponded to one *uidA* allele by excising and sequencing 15 bands. All the sequences obtained from excised DGGE bands corresponded to *uidA* sequences. Bands excising at the same place from different fingerprints retrieved a same *uidA* allele. Bands excising at two different places showed different *uidA* sequences except in 2 cases (bands M and E and bands A and I). A great variability of *E. coli* populations was observed in over all samples. The highest genetic diversity of *E. coli* populations was recovered in *Rumex* soil samples (a mean of 12 bands per fingerprint) and the lowest in downhill topsoil under *Poa* grassland (3 bands per fingerprint) at all sampling dates.

The analysis of the genetic relatedness of *E. coli* populations was studied by either partial *uidA* cloning/sequencing from isolates and by *uidA* PCR-DGGE. Ninety five *uidA* PCR products from water, cow pat and different soils were sequenced. All *uidA* PCR products corresponded to *uidA* sequences of *E. coli* with more than 95% homology. The phylogenetic tree derived from the analysis of these sequences evidenced 6 main groups (Figure 43). All of them clustered with known sequences of *E. coli* except one group (8 sequences) comprising *uidA* sequences from cow pat or soils but none from water. The two isolates supporting this *uidA* sequence (iP4 and iCP1) were characterized as *E. coli* in Texier et al. (*in press*).

#### III.2. *E. coli* populations at the discharge of the watershed

At the discharge of the watershed, each water samples contain several genetically distinct *E. coli* populations. Whilst the cloning/sequencing approach revealed 4 different groups of *uidA* sequences retrieved from water, the DGGE fingerprints of water samples were constituted of 9 (direct extraction) or 12 (after a culture enrichment step) different main



bands. DGGE bands T, D, and U may represent minor water *E. coli* populations whose cell numbers drastically increased when cultured in growth media. On the other side, band B may represent a rather unculturable *E. coli* populations (according to growth conditions used in this study). DGGE bands A, E, I, C, M and T belong to the four phylogenetic groups containing *uidA* sequences retrieved from water (Figure 43).

The TTC-Tergitol and MUG-Ec growth media gave same result with regard to the genetic diversity of culturable water *E. coli* populations.

Whatever the time period during the pasture season (at its beginning, middle, end or just after the departure of herds) and whatever the water flow regime (weak flow or flood), the fingerprints were highly similar in terms of band number and intensity.

### III.3. Potential sources of water contamination

Fourteen fingerprints from cow pats were obtained and analyzed. A mean of 8 bands was recovered per fingerprints. On each fingerprint, only 1 or 2 bands supported the majority of the total band intensity. Overall 20 and 18 different bands were found respectively on 2 days-cow pat and 30 days-cow pat fingerprints, the majority of these bands having a weak intensity. 3 bands (B, K and T) were recovered only from fresh cow pats and not from old pat. Band O was not recovered on fingerprints from pats (Table 18). *E. coli* populations within wild fauna dejections presented a quite similar diversity level (13 different alleles with two being dominants (A and C)) (Table 18).

Whereas a global similar view of *E. coli* populations structure was observed in water once DNA was directly extracted or extracted after an enrichment step, these methods gave distinct fingerprints on bovine dejection samples (Table 18 and Figure 44). Analysis of correlation circle showed that this difference was explained by alleles supporting weak relative intensity (data not shown).

All bands retrieved from water were present in cow pats (Table 18). Most of cow dejection fingerprints, except 2 (lines 2 and 3 figure 45) were the closest from water fingerprints whereas those of wild herbivorous dejection formed a particular cluster (Figure 44).

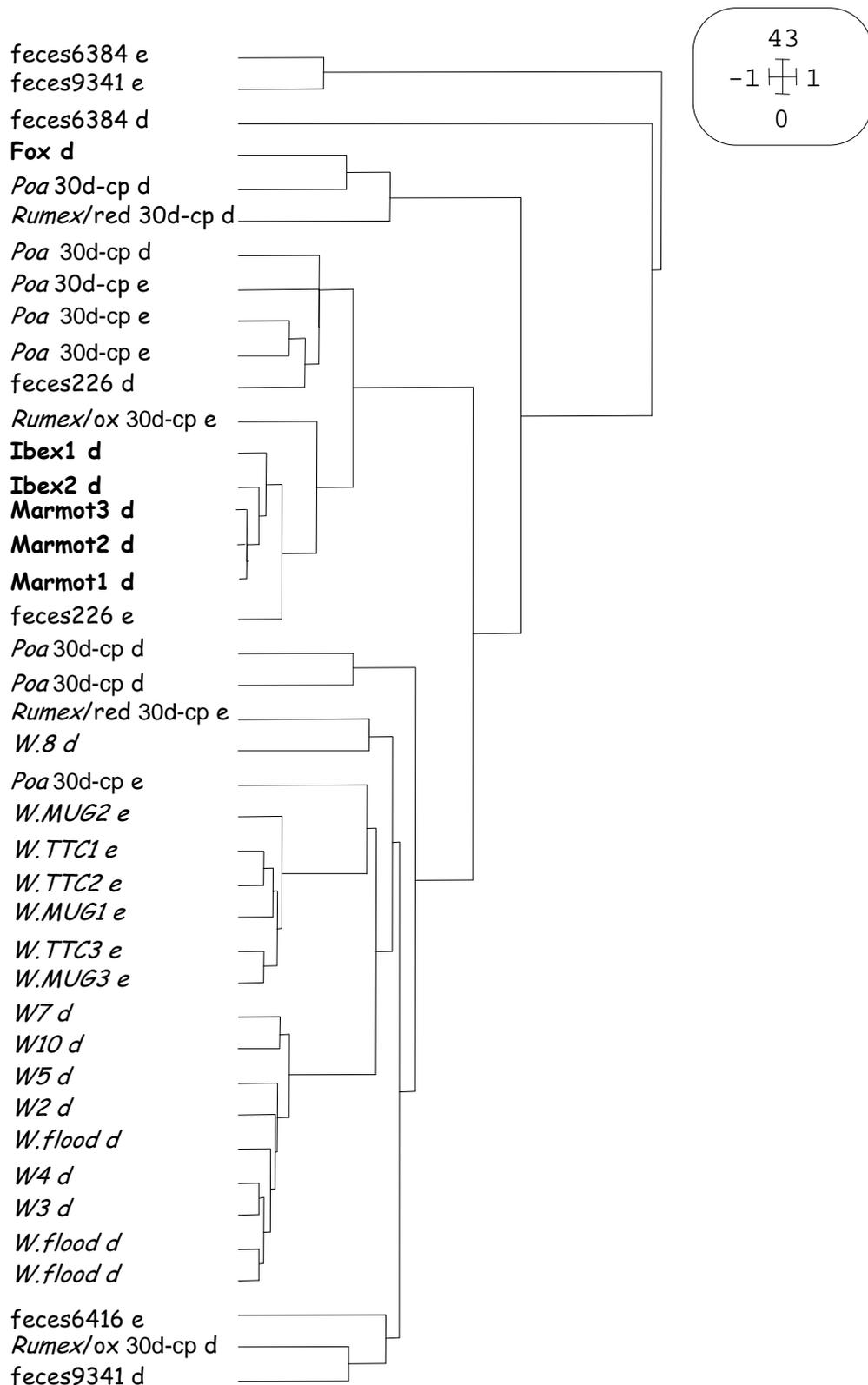


Figure 44 : Cluster analysis of *E. coli uidA* patterns obtained from water (W), wild fauna (in bold), from rectal samples (fecesX) and from 30 days old cow dejections (30d-cp). d for profiles obtained by direct DNA extraction. e for profiles obtained after an enrichment phase. Samples named *W.flood* were collected during flood periods and *WX* during low water flow periods during the pasture season. Samples named *W.TTC* and *W.MUG* were collected during low water flood period and analysed after an enrichment step on TTC or MUG culture media.

#### III.4. *E. coli* populations in different soils

The highest diversity was observed in soils under *Rumex* grasslands. Between 8 and 12 different bands were found in the different soil layers under the *Rumex*/reduced grassland. Under *Rumex*/oxidized grassland, 6 to 12 different bands were actually found on fingerprints with differences between soil layers. Indeed, 6 to 7 bands were retrieved from the soil layers downhill cow pat whereas a higher diversity was found in soil under cow pat (between 9 to 12). Under *Poa* grassland, only 3 different bands were found in the topsoil downhill cow pat while 5 and 8 different bands appeared on the fingerprints on subsoil and topsoil under pat, respectively (data not shown).

Pasture units which were currently low grazed (*Nardus* and *Caltha* grasslands) presented singular fingerprints. Indeed, the same 13 alleles (B, C, D, F, G, H, I, J, M, N, R, P, Q) were found on all analysed fingerprints whereas highly grazed pastures (*Poa* and *Rumex* grasslands) showed more variation between different fingerprints (Table 18). Indeed, only 5 alleles (B, C, D, F and G) were present on all fingerprints of particular layers under the two types of *Rumex* grasslands and the allele A was present on all fingerprints recovered from subsoil under *Poa* grassland. These 6 alleles correspond to bands with among the highest intensities and then, may correspond to dominant populations. Some bands were absent in all fingerprints of soil under *Rumex*/oxidized grasslands (R, W and U) (Table 18).

#### III.5. Watershed functioning

All cow pat alleles were recovered in soil samples (Table 18). Band T was recovered with a high intensity on fingerprints from 2 fresh cow pats but this band has disappeared from those pats after 1 month. This band was recovered only on fingerprints obtained from topsoil and subsoil under these cow pats in June when these latter were still present on the soil surface. The subsoil where the band T was recovered was developed under *Poa* grassland and corresponded to a well-drained soil layer. The *uidA* allele corresponding to this band is highly homologous to the partial *uidA* sequence from a pathogenic *E. coli* strain (Figure 43). In water, all alleles retrieved from samples were found in soils and pats. Nevertheless, 5 alleles (K, L, P, W, Q) found in soils under grazed pastures and pats were never retrieved from water samples (Table 18).

All fingerprints (99) from water, soils and cow pats were analysed together in order to investigate the relationships between the different compartments of the watershed and to try to assign the potential sources of water contamination (Figure 45). Fingerprints clustered in

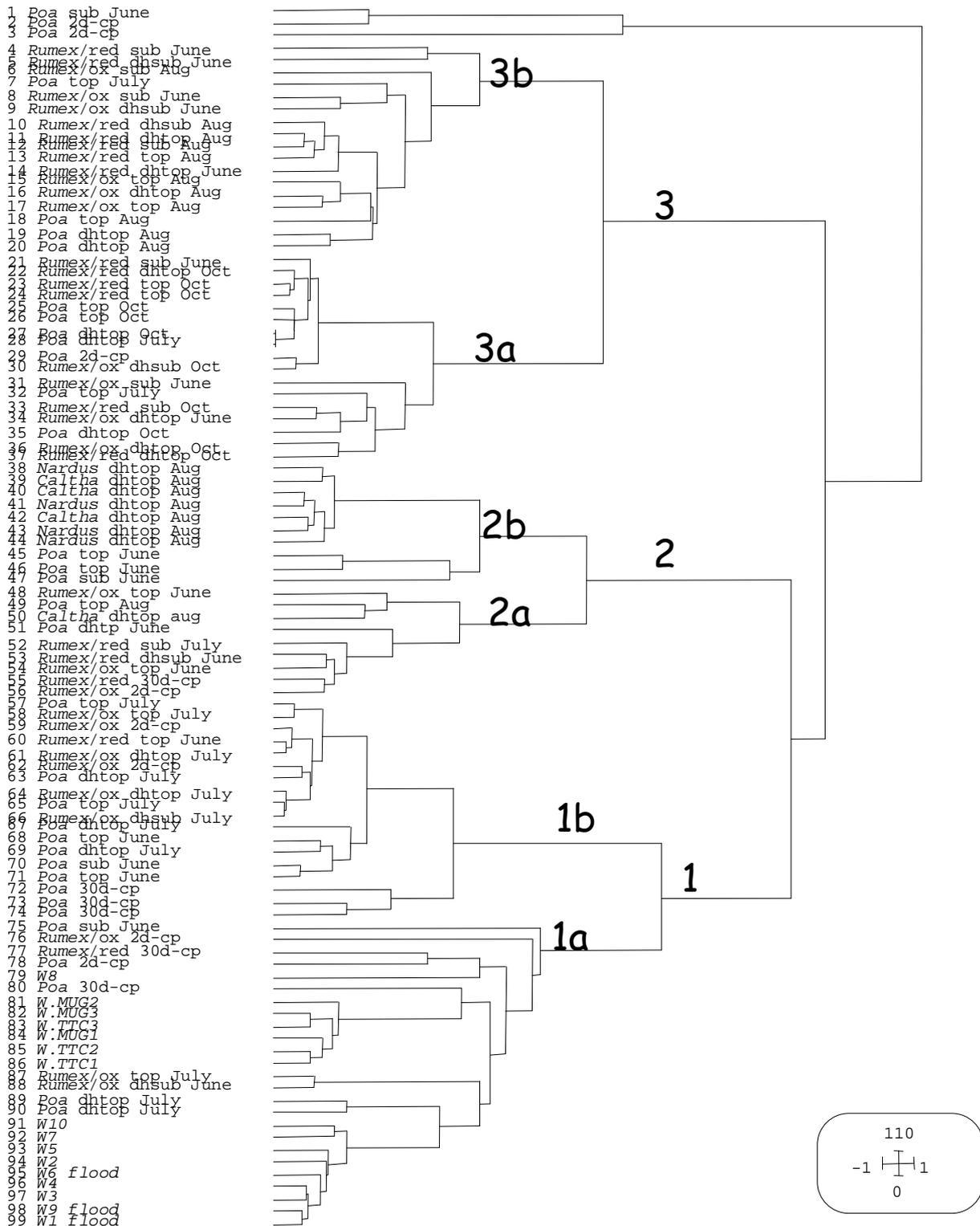


Figure 45 : Repartition of different fingerprints obtained from soil, cow pat and water samples according to a clustering analysis. top stands for topsoil samples collected under cow pat, sub stands for subsoil samples collected under cow pat, dhtop stands for topsoil samples collected downhill cow pat and dhs sub stands for subsoil samples collected downhill cow pat. June, July, Aug and Oct indicate the sampling date. 2d-cp and 30-cp stand respectively for 2 day-old cow pat and for 30 day-old cow pat. *Poa*, *Rumex/red*, *Rumex/ox*, *Caltha* and *Nardus* stand for the pasture unit wherein soil and cow pat samples were collected. WX stands for water samples collected during low water flood period, after direct DNA extraction. W.flood stands for water samples collected during flood period, after direct DNA extraction. W.MUG and W.TTC stand for water samples collected during low water flood period, after enrichment step on MUG ou TTC

three main groups and each one could be divided into two subgroups. The cluster 1 contained all fingerprints from water, most fingerprints of cow pat (9/14) and of soil layers under *Poa* when cow pats were still present above (*i.e.* 4/9 in June and 6/9 in July). This cluster contained also fingerprints recovered from *Rumex*/oxidized in the case of recent contamination (*i.e.* 5/5 in July). More precisely, cluster 1a contained all fingerprints from water. It grouped also 4 fingerprints from cow pats on the 9 belonging to the cluster 1. Only one DGGE fingerprint of soil under *Rumex*/reduced grassland out of 15 belonged to this cluster. Concerning the cluster 2, the cluster 2a mainly grouped 2 fingerprints recovered from cow pat samples out of 14 and 4 fingerprints out of the 9 analysed for soils under *Poa* in June. Most fingerprints (7/8) obtained from soils under recent low grazed pastures were grouped in the cluster 2b.

The highest proportion of *Rumex*/reduced fingerprints (13/16) belonged to the cluster 3. This cluster can be separated in 2 subclusters according to the sampling dates of the samples. In fact, whatever the pasture unit, all fingerprints recovered from soils sampled in October mainly grouped in subcluster 3a and those recovered in August grouped in subcluster 3b.

### III.6. Survival of *E. coli* isolates with diverse origins in the *Rumex* and *Poa* soils.

The *uidA* allele of the cow pat strain corresponds to the DGGE-band B, an allele never recovered in water after enrichment step. That harbouring by the *Poa* strain corresponds to the DGGE-band A; in other word, to the allele which was enriched in soil under *Poa*. The *uidA* allele of the *Rumex* strain corresponds also to the DGGE-band A. In *Rumex*/reduced soil, the DGGE-band A was recovered in soils under pats and never downhill pats.

Results of inoculation experiments are presented Figure 46. In *Poa*, *E. coli* cell number decreased at the beginning of the experiment from  $5.10^8$  to around  $10^6$  cells/g dry soil within 14 days for the three strains. Then, their populations remained at relatively stable numbers until the end of the experiment (60 days) whereas the laboratory *E. coli* DH5a strain did not survive in *Poa* soil (data not shown). In *Rumex*, survival differed according to the strain's origin. The cow pat strain population strongly decreased and its number became undetectable within 10 days. The *Poa* strain cell number decreased also but more slowly since  $6.10^6$  cells/g dry soil were detected after 10 days, around  $2.10^2$  cells/g dry soil after 28 days, and after 60 days, no cell was detected. The *Rumex* strain remained at  $10^6$  cells/g dry soil during the first

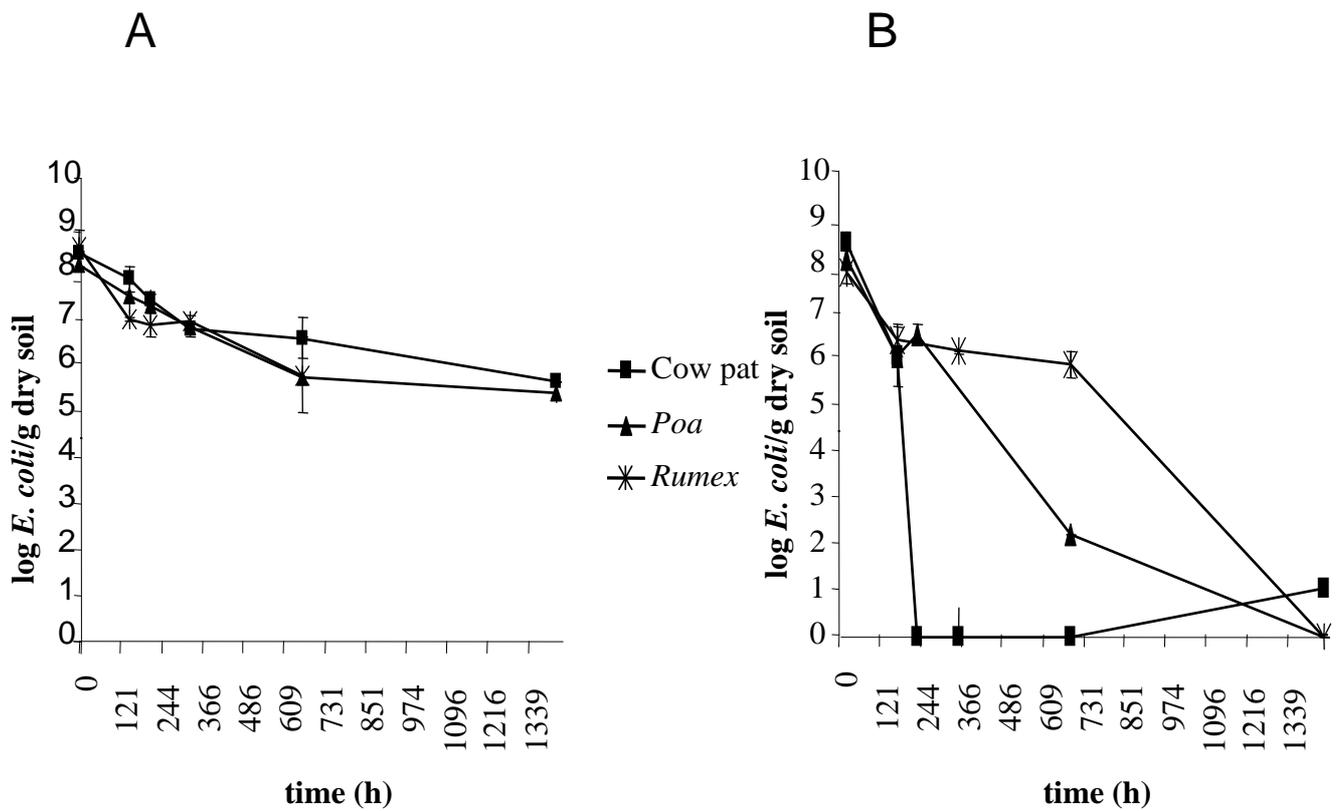


Figure 46 : Survival of *E. coli* in soils collected under *Poa* (A) and under *Rumex* (B) grasslands. Isolates chosen were selected according to their origins (cow pat, *Poa* or *Rumex*) and the *uidA* allele that they harbour. Concentrations are expressed by log *E. coli* per g dry soil.

28 days and like the 2 other strains, became undetectable within 60 days. In *Rumex* soil, *E. coli* DH5 $\alpha$  number decreased dramatically after 3h (data not shown).

#### IV. Discussion

In this study, we aimed to evaluate the structure of *E. coli* populations in different environmental compartments of a dairy watershed by assessing the diversity of *uidA* gene, encoding the  $\beta$ -D-glucuronidase. DGGE on other gene sequences has been only performed on 16S-23S intergenic spacer region (ISR) to evaluate the sources of *E. coli* populations recovered from water (Buchan *et al.*, 2001). With ISR, the high observed diversity made difficult to track the sources of *E. coli* water contamination due to the complexity of banding patterns from *E. coli* isolates. Using PCR-DGGE on *uidA*, up to 22 different bands, were recovered from a whole set of samples, including cow pats, soil layers from different soils and water belonging to the same hydrological watershed. These 22 distinct bands corresponded each to a particular allele, showing the sensitivity of this population approach. Contrastingly, only 6 main groups of *uidA* sequences were evidenced in the phylogenetic tree obtained by sequencing isolates. Likewise, using *uidA* PCR-DGGE based on a strain approach, (Lasalde *et al.*, 2005) differentiated only 9 melting types on 100 *E. coli* isolates retrieved from pristine forest soil. As suggested by (Sigler & Pasutti, 2006) who were interested in *E. coli* diversity in secondary habitats (water and sediments), we demonstrated *uidA* PCR-DGGE on mixed assemblages as an efficient tool to describe the diversity of natural *E. coli* populations in soils. In our study, beside the access to minor populations, *uidA* PCR-DGGE experiments provided fingerprints with either different banding patterns or similarities, which allow to follow the relationships between environmental *E. coli* populations along a watershed.

As previously reported (Bettelheim *et al.*, 2005, Johnson *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2004, Aslam *et al.*, 2003, Hartel *et al.*, 2003, McLellan *et al.*, 2003, Jarvis *et al.*, 2000, Cray *et al.*, 1998), *E. coli* banding patterns recovered in different cow pats present a high diversity. Changes were observed during the 30 day decay of the pats *i.e.* the disappearance of certain alleles or the increase/decrease of the intensity of some bands. This phenomenon has been already highlighted but the reasons of these changes are mostly unknown (Bekal *et al.*). All alleles recovered from cow pats were observed in the soil samples. This means that cow pats may be considered as the main source for *E. coli* recovered from soil environments.



The transfer from pat to soil was pointed out by the careful scrutiny of the distribution of one particular band (T), but may correspond to *uidA* sequence from a pathogen. This band was only found in 2 fresh pats and in the top and subsoil layers under these pats when cow pat were still present above. Plus, one particular allele (S) which was retrieved from pats fingerprints was found in only one soil developed under the most grazed unit (*Poa*). The transfer between pats and topsoil may be due to soil water infiltration as well as soil fauna activity (Williams *et al.*, 2006, Oliver *et al.*, 2005, George *et al.*, 2004, Jamieson *et al.*, 2002, Joergensen *et al.*, 1998, Van Donsel *et al.*, 1967). The subsoil layer where this allele was detected is a well-drained soil. Thus, this population can be suspected to be transferred from pat to deep soil through water infiltration.

The analysis of *uidA* bands occurrence in different soil samples highlighted the selection of particular *E. coli* populations according to the grazing level of grasslands. *E. coli* population structure retrieved in low grazed units (*Nardus* and *Caltha*), *i.e.* with low recent cow pat inputs, showed singular fingerprints. Indeed, the same 13 alleles were recovered in all *Nardus* and *Caltha* grasslands samples whilst the grazed pastures (*Rumex* and *Poa* grasslands) presented diverse fingerprints resulting from various associations of the 22 alleles.

Five alleles (B, C, D, F and G) among 22 were always present in *Rumex* soil layers and one (A) among 22 in *Poa* subsoil whilst pats did not present such selectivity whatever the alleles are. Moreover, one allele (O) was never found in pat but was found in some *Rumex* and *Poa* soil layer samples. The populations harbouring all these alleles may be considered as naturalized *E. coli* populations. These results support our previous hypothesis of *E. coli* naturalization which was formulated in a study dealing with the persistence of *E. coli* in soils of the same watershed (Texier *et al.*, *in press*). Other studies on tropical (Byappanahalli & Fujioka, 2004) or temperate (Ishii *et al.*, 2006, Byappanahalli *et al.*, 2006) soils raised also the same hypothesis which contradicts the use of *E. coli* as indicator of recent fecal contamination. We can wonder if a cessation of pasture on *Rumex* and *Poa* grasslands will conduct to a loss of diversity due to the selection of soil naturalized (*i.e.* adapted or acclimated) populations as observed in soils under *Nardus* and *Caltha* grasslands. These naturalized populations should have the ability to better survive in soils than populations transferred recently to soil from cow pat, as demonstrated by the inoculation experiments. *E. coli* strains isolated from soil under *Poa* and *Rumex*, and supporting the same *uidA* allele, presented different behaviours according to the soil wherein they were inoculated. This reflects the difference of adapting capacity of strains according to the nature of the receptor medium.



The comparison of two methods based on culture and on direct extraction ensued to the same global view of *E. coli* diversity in water. Usually, differences are observed between method based on culture of microorganisms and method independent on culture due to the occurrence of Viable But Not Culturable (VBNC) bacterial cells in the environment especially in freshwater (Dewettinck *et al.*, 2001). Here, except for one allele (B), the similarity of profiles obtained by both methods suggests that main *E. coli* populations did not enter in a VBNC state in freshwater, as previously reported by (Farnleitner *et al.*, 2000). Then, a surprisingly steady-state of *E. coli* population structure was observed during the whole pasture season whatever the flow of the creek was (low water flow or flood period) whereas shifts of *E. coli* concentrations were noted (data not shown). These quantitative but not qualitative variations suggest that the same compartments supplied the discharge of the watershed whatever the period of the pasture and the flow of the creek are.

However, the culturable- and unculturable-based methods gave different allele patterns for animal dejections and the differences were supported by minor alleles. Here, we can speculate it may be due to (i) a better efficiency of direct extraction, (ii) the occurrence of VBNC cells in cow pats or (iii) the fact that enrichment step may have not favoured the growth of minor populations. Nevertheless, the question of VBNC state in pats remains unclear as they constitute a nutrient rich environment for *E. coli*, closed to that found in digestive tract of cows. Unfortunately, we cannot go on with the VBNC topics within soils as, during the course of this study, assays to directly amplify *uidA* alleles from soils were carried out but failed probably due to the low level of *E. coli* populations in soils ( $10^4$  cells  $g^{-1}$ , Texier *et al.*, *in press*).

The clustering analysis of fingerprints allows to assess that the closest fingerprints to those found in water at the discharge of the watershed were retrieved from cow dejections. This supports the fact that cow pats are the main sources of *E. coli* contamination in water beside wild fauna dejections and soil stocks.

The relationship between different fingerprints evidences that the behaviour of *E. coli* populations can be related to the different soil water dynamics. Indeed, soil fingerprints closed to those found in water were obtained from a well drained soil (*Poa*) under freshly deposited cow pat. In soil with more limited water fluxes (*Rumex*/oxidized), *E. coli* populations are also but less influenced by the presence of pat. After the cow pat decay, closed population structures were observed in both soils, suggesting the spreading out of soil naturalized *E. coli* populations. The composition of these naturalized populations seems weakly influenced by



the physicochemical properties (e.g. pH, presence of toxic  $Al^{3+}$  ions, organic carbon, oxygen disponibility) differentiating these soils.

In the case of saturated and confined soil (*Rumex*/reduced), *E. coli* fingerprints in soil are not influenced by the presence of cow pat. Mixed *E. coli* assemblages retrieved in this soil are not recovered in water, even if some populations could be independently found. This result is supported by the observations of (Muirhead *et al.*, 2006b, Muirhead *et al.*, 2006a). During overland flow experiments performed on saturated soils, *E. coli* was shown to be predominantly transported from fecal material to water within small free particles by runoff and their transfer into soil to be scarce.

In this study, we validated the use of *uidA* PCR-DGGE to follow the transfer of *E. coli* populations through the pat-, soil- and water-compartments of a dairy pastured watershed. *E. coli* populations retrieved in water at the discharge of the watershed mainly originated from recent fecal inputs *i.e.* directly from pat and/or from drained soils.

## V. Acknowledgments

We thank C. Commeaux, E. Attard and F. Poly for technical help to carry out DGGE experiments and to use GelCompar II v3.00 software. This work was funded by a GESSOL project (“Pastor”) from the Ministère de l’Ecologie et du Développement Durable (France). S. Texier was supported by a grant from the Institut National de la Recherche Agronomique and from the Assemblée des Pays de Savoie.



## VI. References

- Aslam, M., F. Nattress, G. Greer, C. Yost, C. Gill & L. McMullen, (2003) Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2794-2799.
- Bej, A. K., J. L. DiCesare, L. Haff & R. M. Atlas, (1991) Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1013-1017.
- Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother & J. Harel, (2003) Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2113-2125.
- Bertani, G., (1951) Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 293-300.
- Bettelheim, K. A., A. Kuzevski, R. A. Gilbert, D. O. Krause & C. S. McSweeney, (2005) The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. *Journal of Appl. Microbiology* **98**: 699-709.
- Buchan, A., M. Alber & R. E. Hodson, (2001) Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 313-321.
- Byappanahalli, M. & R. Fujioka, (2004) Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. *Water Sci. Technol.* **50**: 27-32.
- Byappanahalli, M. N. & R. S. Fujioka, (1998) Evidence that tropical soil environment can support the growth of *Escherichia coli*. *Wat. Sci. Tech.* **38** 171-174
- Byappanahalli, M. N., R. L. Whitman, D.A. Shively, M. J. Sadowsky & S. Ishii, (2006) Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environmental Microbiology* **8**: 504-513.
- Cray, W. C., Jr., T. A. Casey, B. T. Bosworth & M. A. Rasmussen, (1998) Effect of Dietary Stress on Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Calves. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1975-1979.
- Dewettinck, T., W. Hulsbosch, K. V. Hege, E. M. Top & W. Verstraete, (2001) Molecular fingerprinting of bacterial populations in groundwater and bottled mineral water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 412-418.
- Farnleitner, A. H., L. Hocke, C. Beiwel, G. C. Kavka, T. Zechmeister, A. K. T. Kirschner & R. L. Mach, (2001) Rapid enzymatic detection of *Escherichia coli* contamination in polluted river water. *Letters in Appl. Microbiology* **33**: 246-250.
- Farnleitner, A. H., N. Kreuzinger, G. G. Kavka, S. Grillenberger, J. Rath & R. L. Mach, (2000) Simultaneous detection and differentiation of *Escherichia coli* populations from environmental freshwaters by means of sequence variation in a fragment of the  $\beta$ -D-glucuronidase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1340-1346.
- Favre-Bonte, S., L. Ranjard, C. Colinon, C. Prigent-Combaret, S. Nazaret & B. Cournoyer, (2005) Freshwater selenium-methylating bacterial thiopurine methyltransferases: diversity and molecular phylogeny. *Environmental Microbiology* **7**: 153-164.
- George, I., A. Anzil & P. Servais, (2004) Quantification of fecal coliform inputs to aquatic systems through soil leaching. *Water Res.* **38**: 611-618.
- Greenberg, A. F., L. S. Clescerl & A. D. Eaton, (1992) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Am. Public Health Assoc., Washington DC.



- Hartel, P. G., J. D. Summer & W. I. Segars, (2003) Deer diet affects ribotype diversity of *Escherichia coli* for bacterial source tracking. *Water Res.* **37**: 3263-3268.
- Hernandez, J. F., J. M. Guibert, J. M. Delattre, C. Oger, C. Charrière, B. Hugues, R. Serceau & F. Sinegre, (1991) Evaluation of miniaturized procedure for enumeration of *Escherichia coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4-methylumbelliferyl -D-glucuronide. *Water Res.* **25**: 1073-1078.
- Ishii, S., W. B. Ksoll, R. E. Hicks & M. J. Sadowsky, (2006) Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 612-621.
- Jamieson, R. C., R. J. Gordon, K. E. Sharples, G. W. Stratton & A. Madani, (2002) Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water : a review. *Can. biosys. eng.* **44**.
- Jarvis, G. N., M. G. Kizoulis, F. Diez-Gonzalez & J. B. Russell, (2000) The genetic diversity of predominant *Escherichia coli* strains isolated from cattle fed various amounts of hay and grain. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**: 225-233.
- Joergensen, R. G., H. Kuntzel, S. Scheu & D. Seitz, (1998) Movement of faecal indicator organisms in earthworm channels under a loamy arable and grassland soil. *Appl. Soil Ecol.* **8**: 1-10.
- Johnson, L. K., M. B. Brown, E. A. Carruthers, J. A. Ferguson, P. E. Dombek & M. J. Sadowsky, (2004) Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4478-4485.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen & M. Nei, (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.
- Lasalde, C., R. Rodriguez, H. H. Smith & G. Toranzos, (2005) Heterogeneity of *uidA* gene in environmental *Escherichia coli* populations. *J. Water Health* **3**: 297-304.
- Martins, M. T., I. G. Rivera, D. L. Clark, M. H. Stewart, R. L. Wolfe & B. H. Olson, (1993) Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of beta-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide media. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2271-2276.
- McLellan, S. L., A. D. Daniels & A. K. Salmore, (2003) Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2587-2594.
- Muirhead, R. W., R. P. Collins & P. J. Bremer, (2006a) Interaction of *Escherichia coli* and soil particles in runoff. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3406-3411.
- Muirhead, R. W., R. P. Collins & P. J. Bremer, (2006b) Numbers and transported state of *Escherichia coli* in runoff direct from fresh cow pats under simulated rainfall. *Letters in Appl. Microbiology* **42**: 83-87.
- Muyzer, G., E. C. de Waal & A. G. Uitterlinden, (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Oliver, D. M., C. D. Clegg, P. M. Haygarth & A. L. Heathwaite, (2005) Assessing the potential for pathogen transfer from grassland soils to surface waters. *Adv. Agron.* **85**: 125-180.
- Parveen, S., R. L. Murphree, L. Edmiston, C. W. Kaspar, K. M. Portier & M. L. Tamplin, (1997) Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2607-2612.



- Pupo, G. M., R. Lan, P. R. Reeves & P. R. Baverstock, (2000) Population genetics of *Escherichia coli* in a natural population of native Australian rats. *Environmental Microbiology* **2**: 594-610.
- Saitou, N. & M. Nei, (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Sigler, V. & L. Pasutti, (2006) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to differentiate *Escherichia coli* populations in secondary environments. *Environmental Microbiology* **8**: 1703-1711.
- Souza, V., M. Rocha, A. Valera & L. E. Eguiarte, (1999) Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3373-3385.
- Texier, S., C. Prigent-Combaret, M. H. Gourdon, M. A. Poirier, P. Faivre, J. M. Dorioz, J. Poulénard, L. Jocteur-Monrozier, Y. Moëgne-Loccoz & D. Trevisan, (2008) Persistence of culturable *Escherichia coli* fecal contaminants in dairy alpine grassland soils *J. Environ. Qual.* **37**: 2299-2310.
- Van Donsel, D. J., E. E. Geldreich & N. A. Clarke, (1967) Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to storm-water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **15**: 1362-1370.
- Williams, A. P., P. Roberts, L. M. Avery, K. Killham & D. L. Jones, (2006) Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 54-64.
- Yang, H.-H., R. T. Vinopal, D. Grasso & B. F. Smets, (2004) High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1528-1536.



## **Conclusion générale et perspectives**



## Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'apporter de nouvelles connaissances sur l'écologie d'*E. coli* dans les écosystèmes pâturés en étudiant la dispersion et la survie de cette espèce bactérienne dans les différents niveaux d'organisation d'un bassin versant subalpin. Le but est d'en tirer des conséquences en terme de transfert sol/eaux de surface et de risque associé pour la qualité microbiologique de l'eau de montagne. A ces fins, les effectifs et la structure génétique des populations d'*E. coli* ont été comparés dans les différents compartiments d'un bassin versant pâturé par des troupeaux de vaches laitières : dans les bouses (stock primaire), dans les sols (stock secondaire potentiel) et dans l'eau à l'exutoire. Afin d'analyser l'état physiologique (état de division ou dormance) dans lequel les *E. coli* résident dans le sol, la mise au point d'une méthode moléculaire basée sur le suivi de l'expression de gènes marqueurs des phases exponentielle et stationnaire de croissance a été initiée.

L'étude de la dynamique des populations d'*E. coli* dans les sols (chapitre 2) a montré que le sol rhizosphérique constitue un réservoir environnemental permanent en *E. coli* avec des niveaux de populations proches de la capacité biotique du milieu, que le sol soit ou non exposé à une bouse. La rhizosphère représente un habitat riche en éléments nutritifs du fait de l'abondance d'exsudats racinaires ; pour certains pathogènes de l'homme ou l'animal, ces propriétés trophiques sont un facteur favorable à leur survie (Berg *et al.*, 2005). Dans le cas d'*E. coli*, ses effectifs, dans la zone superficielle de la rhizosphère, sont stables et ne sont pas influencés par (1) le niveau de pression pastorale, (2) les caractéristiques physico-chimiques du sol et le type de végétation, ou (3) les saisons (pâturage, présence du manteau neigeux, fonte des neiges). Les réponses observées sont donc différentes de celles liées à l'épandage d'effluents d'élevages (lisier, fumier) pour lequel la survie des contaminants fécaux dans les sols est généralement assez limitée dans le temps et est fortement influencée par les conditions environnementales (Crane *et al.*, 1983; Jiang *et al.*, 2002 ; Trevisan *et al.*, 2002; Vansteelant, 2003 ; Tyrrel & Quinton, 2003 ; Oliver, 2005 ; Williams *et al.*, 2007 ; Frémaux *et al.*, sous presse). Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse d'une véritable naturalisation des *E. coli* dans les sols pâturés, laquelle est probablement liée à l'exploitation de longue date de l'alpage et à l'introduction de bouses au cours des saisons pastorales. Cette hypothèse a également été formulée par d'autres auteurs qui ont révélé la distribution ubiquiste d'*E. coli* dans des sols tempérés et tropicaux, ce qui les amènent à remettre en cause



son utilisation en tant qu'indicateur et traceur de contamination fécale (Byappanahalli & Fujioka, 2004; Ishii *et al.*, 2006, Byappanahalli *et al.*, 2006).

Dans les horizons plus profonds, la présence d'*E. coli* varie en fonction des stations pastorales et plus particulièrement avec le comportement hydrique et biogéochimique des sols. Un sous-sol drainant ne permet pas le maintien d'*E. coli* en profondeur, sauf si la contamination est récente. Dans ces conditions de transfert rapide vers les horizons profonds, les effectifs en *E. coli* sont équivalents à ceux présents en surface. A l'inverse, lorsque la bouse vieillit et que le stock primaire décroît, les effectifs en *E. coli* détectés en profondeur diminuent et peuvent devenir indétectable. C'est le cas lorsque les contraintes nutritionnelles et physicochimiques sont déterminantes, comme dans les horizons de sol où les circulations latérales conduisent à l'acidification du milieu, probablement à cause de concentrations toxiques en ions  $Al^{3+}$ . Dans le cas d'un sous-sol confiné, localisé dans une nappe imperméable et où la matière organique est fortement décomposée, aucune différence d'effectifs n'a été révélée entre l'horizon de surface et la profondeur. Ce travail a montré que la dynamique des populations d'*E. coli* en sous-sol est liée au régime hydrique des sols, lesquels déterminent les dynamiques d'importation et d'exportation de bactéries, mais aussi les conditions trophiques et les propriétés physicochimiques du milieu récepteur. L'existence de populations fécales dans les sous-sols drainants pourraient ainsi indiquer que ces horizons constituent des sources potentielles de contamination du cours d'eau de l'alpage à l'exutoire.

Les conditions de survie d'*E. coli* dans le sol sont différentes selon que l'on considère la surface ou l'horizon profond. En surface, disponibilité de substrats nutritifs et sites refuges permettent la survie et l'adaptation d'*E. coli* alors qu'en profondeur, les contraintes physicochimiques ou nutritives peuvent être fortes et conduire au déclin des populations d'*E. coli*. On montre en outre que les *E. coli* ne possèdent pas les mêmes stratégies de survie que les *Pseudomonas* spp. fluorescents

L'étude de la structure génétique des populations d'*E. coli* dans les bouses, les sols et l'eau à l'exutoire du bassin versant (chapitre 4) a permis de confirmer certains résultats relatifs à la circulation des *E. coli* des bouses vers les horizons profonds, et notamment le rôle déterminant joué par le régime hydrique des sols. Comme révélé par différents auteurs, la structure génétique des populations environnementales d'*E. coli* est complexe tant au niveau des stocks primaires que secondaires (Sigler & Pasutti, 2006 ; Bettelheim *et al.*, 2005 ; Johnson *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2004 ; Aslam *et al.*, 2003). Les populations présentes dans les bouses montrent cependant une plus grande diversité que celles trouvées dans les sols et



l'eau. La structure des populations d'*E. coli* dans les bouses évolue dans le temps, probablement du fait de la minéralisation et de la dessiccation de la matière organique qui pourraient ainsi conduire à la disparition et à la sélection de certaines populations. Les profils des populations issues de bouse sont proches de ceux des populations présentes dans l'eau alors que ceux issus de la faune sauvage en sont éloignés. Ceci signifie que la pollution du cours d'eau de l'alpage est due principalement à l'activité agricole et que la faune sauvage y contribue peu. Les profils génétiques issus des sols drainants, lorsque ceux-ci sont depuis peu soumis à la présence d'une bouse, sont également proches de ceux de l'eau. Au contraire, les populations détectées dans les sols confinés et saturés en eau présentent des profils distants de ceux des populations des bouses et de l'eau. A l'inverse des bouses et des sols sous prairies récemment pâturées, l'analyse des sols actuellement peu pâturés a révélé des structures des populations d'*E. coli* spécifiques, présentant une plus faible diversité et une plus faible variabilité inter-profils. La spécificité de ces profils, éloignés de ceux des bouses, suggère que les populations d'*E. coli* les constituant ont été sélectionnées et représentent des populations adaptées au sol. On peut se demander si un arrêt de pâturage sur les stations pastorales *Poa* et *Rumex* conduirait à une structure de populations identiques à celle trouvée sur les stations *Caltha* et *Nardus*.

L'étude de la structure génétique des populations d'*E. coli* a permis de révéler une diversité des populations et l'existence de structures de populations typiques pour certains sols. Cette étude a également confirmé l'hypothèse liée à la circulation des *E. coli* des bouses vers le sol profond en relation avec le régime hydrique des sols.

L'étude des capacités d'adaptation d'*E. coli* au sol (chapitre 3) a eu pour but d'étudier l'état physiologique des populations introduites, *E. coli*, et des populations résidentes, les *Pseudomonas* spp. fluorescents, avec la mesure des niveaux d'expression de gènes marqueurs des phases de division et stationnaire de la croissance bactérienne. Par cette approche, on a cherché à mieux apprécier les dynamiques et stratégies adaptatives des populations exogènes. L'expérimentation mise en œuvre nous semble innovante car, à terme, elle serait à même de mettre à disposition des outils moléculaires autorisant l'accès à l'état de division ou de dormance des bactéries fécales dans le sol, ce qui nous paraît être des éléments de progrès par rapport aux approches classiquement centrées sur la viabilité ou l'activité des bactéries. Cependant, étant confrontés à des difficultés méthodologiques, cette approche nécessite encore de développements et compléments d'expérimentation. A l'heure actuelle, elle ne permet pas d'appréhender totalement l'état dans lequel se trouvent les populations d'*E. coli*



dans les sols. Parmi les 6 gènes marqueurs étudiés, 2 d'entre eux (*rpoZ* et *rmf*) se sont toutefois avérés être des candidats potentiels sur la base de leur expression *in vitro* au cours de cinétiques de croissance en milieu de culture liquide. Dans les microcosmes de sol, on montre une correspondance d'ensemble entre l'expression des marqueurs et le comportement des souches d'*E. coli*. Dans des situations à fortes contraintes, la transcription de ces gènes serait liée à une réponse au stress. Dans l'état actuel du développement méthodologique, l'approche initiée au cours de cette thèse ne peut donc pas répondre directement à la question de l'évaluation de l'état physiologique d'*E. coli*. Elle signale cependant des différences de réponse dans la transcription des marqueurs et mérite donc d'être approfondie.

En parallèle à cette approche, le suivi, dans des microcosmes de sol, des cinétiques de survie de souches d'*E. coli* isolées de différents environnements nous a permis de confirmer les capacités d'adaptation d'*E. coli*. Ces expérimentations ont révélé que l'environnement d'origine des souches est important pour leur maintien dans les sols, la souche de laboratoire n'ayant pas la capacité de survivre dans les sols, contrairement à la souche isolée d'une bouse. Comme décrit par Scott *et al.* (2006), le passage d'*E. coli* dans le tube digestif des animaux lui confère un avantage sélectif vis-à-vis de sa survie dans le sol. A partir des différences de taux de survie observées, et notamment de la supériorité des bactéries issues du sol, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'au cours de leur passage dans le sol, les bactéries acquièrent ou expriment des propriétés leur permettant de s'acclimater à cet environnement. Une souche survit d'autant mieux dans son sol d'origine que dans un autre type de sol. Au final, ces travaux montrent que le devenir des bactéries dans un environnement particulier semble dépendre à la fois de leur identité génétique, de leur environnement d'origine et de celui dans lequel elles sont introduites.

En rapprochant les résultats relatifs aux effectifs et ceux portant sur la structure génétique des populations d'*E. coli* dans les sols, on observe, dans les systèmes de sols drainants ouverts, des effectifs constants en surface et une structure des populations d'*E. coli* évoluant dans le temps. Tant que le stock émetteur (la bouse) est présent à la surface de ce type de sol, il affecte la structure des populations dans le sol sous-jacent (surface et profondeur). Dans le mat racinaire, il existe de plus des populations d'*E. coli* naturalisées, aptes à se maintenir dans un environnement riche en matières organiques (présence d'exsudats racinaires), même s'il correspond à un milieu fortement dilué par rapport aux conditions du tube digestif animal. Dans ce type de sol, les populations d'*E. coli* présentes résultent finalement d'un mélange entre populations issues de la bouse et populations naturalisées, ce



mélange évoluant dans le temps en fonction des évènements météorologiques et du vieillissement du stock émetteur. Les *E. coli* des bouses auraient, dans un 1<sup>er</sup> temps, un avantage écologique certain sur ceux du sol puisque transférés des bouses vers le sol simultanément avec des particules de matières organiques fécales, directement utilisables comme source de nutriments. Par contre, cet avantage ne pourrait perdurer dans le temps du fait de la dissolution et de l'évolution de ces matières organiques. Les cinétiques de survie obtenues en microcosmes appuient l'idée que les *E. coli* de la bouse sont capables de s'acclimater (*i.e.* de persister un certain laps de temps dans le sol).

Une des hypothèses que nous avons formulée suite à l'analyse des effectifs en *E. coli* dans les sols était que les populations naturalisées seraient plutôt localisées dans la microporosité du sol, maintenant ainsi leurs effectifs à  $10^4$  cellules  $g^{-1}$  sol sec, ce qui pourrait correspondre à la capacité biotique des sols étudiés pour ce type de population bactérienne. A des niveaux de populations supérieurs, les *E. coli* non localisés dans les micropores saturés seraient alors d'avantage soumis à des interactions biotiques négatives de prédation et d'antagonisme. Des compléments d'analyse devraient être apportés pour confirmer cette hypothèse mais, l'ensemble des faits observés et des connaissances préalables nous laissent penser que la localisation des *E. coli* dans la microporosité du sol est à même d'expliquer les réponses observées.

Notre hypothèse est de considérer qu'une certaine diversité et adaptation des *E. coli* n'est possible que dans la mesure où, en simultanée :

- Des populations primaires sont introduites de façon permanente et continue, durant un délai suffisant, ce qui leur permettrait de coloniser des microsites supports et d'y adapter leur métabolisme.

- Un substrat carboné, compatible à leur fonctionnement primaire, leur est apporté durant un laps de temps nécessaire à cette adaptation.

- Des microsites peuvent offrir des niches refuges où les populations sont susceptibles de se maintenir sans être exposés aux stress qu'elles rencontrent lors de leur introduction dans le sol.

- Les bactéries sont capables d'exprimer les fonctionnalités nécessaires à leur maintien dans ces niches.

L'ensemble de ces conditions se trouvent être réunis dans le contexte de la rhizosphère superficielle des environnements pâturés, qui se distinguent radicalement de celles des situations d'épandage, marquées par des doses d'apport fortes mais instantanées.



L'alpage de Bise est pâturé depuis la création des alpages, c'est-à-dire depuis le XII<sup>e</sup> ou le XIII<sup>e</sup> siècle. Au début, le pâturage était plutôt intensif et sa gestion est devenue, avec la déprime agricole, extensive. C'est probablement ce pâturage de longue durée qui a conduit à l'adaptation de lignées particulières d'*E. coli* dans les différents sols. Pour évaluer comment *E. coli* s'est adapté au sol, l'approche idéale consisterait à étudier, sur le long terme, le devenir d'*E. coli* dans des sols sous pâture dans un bassin versant qui n'a jamais été pâturé ni fréquenté par des animaux auparavant.

Une des hypothèses était de considérer que la période de fontes des neiges représentait une étape cruciale dans la dynamique des populations microbiennes de l'alpage car le ruissellement résultant de cette fonte est *a priori* susceptible d'agir fortement sur les sols. Pour les *Pseudomonas* fluorescents spp., ce rôle est vérifié puisqu'à la fonte des neiges, les effectifs ont chuté drastiquement. Par contre, pour *E. coli*, cela n'est pas vérifié, une grande stabilité des effectifs en *E. coli* dans le sol rhizosphérique ayant été observée toute l'année, même durant ces conditions particulières. Les capacités d'adaptation ne couvriraient donc pas uniquement des aspects nutritionnels mais également le pouvoir d'adhésion d'*E. coli* aux surfaces organiques ou minérales comme les argiles, limitant ainsi leur lessivage. Pour vérifier cette hypothèse, il aurait été intéressant d'accéder à la structure des populations d'*E. coli* dans les différents sols en dehors des périodes de pâturage (i.e. sous le manteau neigeux et après la fonte des neiges) afin de mieux appréhender «l'état initial» de la diversité des populations d'*E. coli* dans les sols avant le début du pâturage et de référencer leur propriétés de surface et leur réponse face au stress nutritionnel.

Les comportements des populations d'*E. coli* et de *Pseudomonas* spp. fluorescents diffèrent. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont principalement associés au système racinaire des végétaux alors que les *E. coli* sont associés à la microporosité des sols. Il est donc raisonnable de penser que ces deux types de populations n'occupent pas la même niche écologique.

Dans l'eau, alors que des événements pluvieux (notamment les crues) conduisent à une augmentation drastique des concentrations en *E. coli*, la structure des populations est stable, suggérant la mobilisation de réservoirs identiques quelque soit le régime d'exportations de l'eau. L'étude des profils génétiques d'*E. coli* dans l'eau a reposé sur un suivi hebdomadaire, sans toutefois détailler précisément les chroniques des événements pluvieux. Il aurait fallu analyser plus finement la structure des populations lors et après des averses et ce,

## Sol avec sous-sol drainant

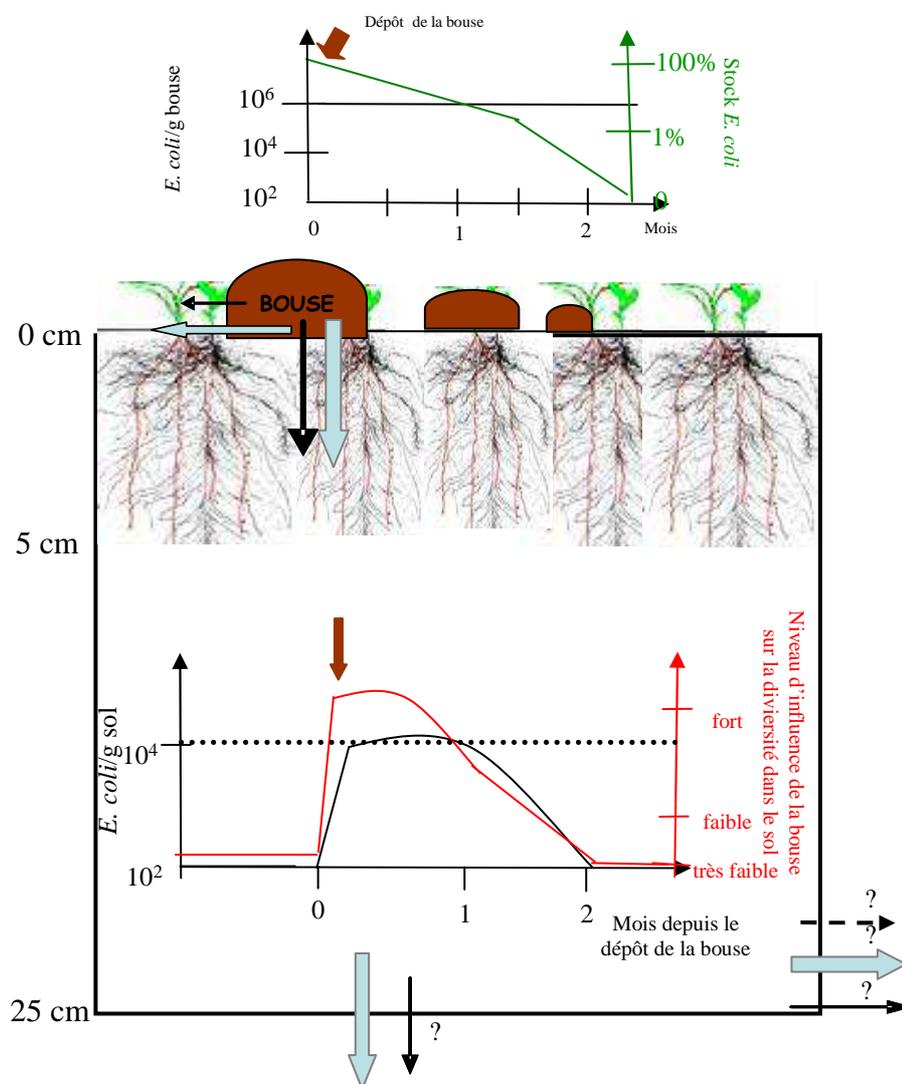


Figure 47 : Schéma fonctionnel du comportement d'*E. coli* dans la rhizosphère et le sous-sol de la station « Poa » du Bassin versant de l'Alpage de Bise. Les flèches noires indiquent les flux potentiels d'*E. coli*, les flèches horizontales le ruissellement et les flèches verticales le lessivage. Le graphique en vert représente les stocks en *E. coli* dans la bouse, le trait noir plein les concentrations en *E. coli* par g de sol de profondeur ou en pointillés noirs, les concentrations en *E. coli* par g de sol de surface. Les graphiques en rouge représentent le niveau d'influence de la bouse sur la structure des populations d'*E. coli* dans le sol. Des niveaux faibles à très faibles d'influence indiquent la présence de populations naturalisées au sol. Les flèches bleues représentent les mouvements d'eau et la bioturbation. Le nombre de cellules par g de sol indique la concentration d'*E. coli* au sein de chaque compartiment. La flèche marron indique le dépôt de la bouse.

durant un laps de temps suffisamment long. Cela nous aurait permis d'étudier les correspondances entre types de populations bactériennes et types de volume d'eau concernés par les écoulements, ainsi que la résilience du système. Cette analyse globale de la diversité suggère néanmoins que les *E. coli* dans l'eau proviennent principalement de contamination fécale récente. Toutefois, il reste à savoir si leur origine est liée au ruissellement des surfaces pastorales, au lessivage des bouses déposées directement dans la rivière ou également au lessivage affectant les sols drainants. Il reste à préciser le devenir des *E. coli* transitant dans les sols drainants. Deux hypothèses peuvent être formulées : la 1<sup>ère</sup> consiste à penser que les *E. coli* sont transférés plus en profondeur vers la nappe phréatique, la 2<sup>nde</sup> que ces *E. coli* ne survivent pas. Il serait probablement pertinent d'étudier la structure, la dynamique et l'état physiologique des populations d'*E. coli* dans les sédiments du cours d'eau, en amont de l'exutoire, ces sédiments représentant une source potentielle importante en *E. coli* susceptibles d'être relargués lors de crues (Stephenson et Rychert, 1982)

Les résultats de cette thèse posent des questions sur l'utilisation d'*E. coli* comme indicateur de contamination fécale, du fait de l'existence de populations naturalisées. L'étude de la diversité génétique des populations d'*E. coli* par PCR-DGGE ciblant le gène *uidA* permet cependant de modérer ce propos puisqu'elle a mis en évidence que les populations mobilisables dans l'eau sont essentiellement des populations fécales et que les populations naturalisées sont sédentaires. Ces populations sont toutefois mobilisables lors des phénomènes d'érosion qui, sur prairies, sont souvent dus au piétinement et à la mise à nu des sols. Dans la mesure où les entraînements d'*E. coli* naturalisés liés à la mise à nu et à l'érosion des sols s'accompagnent de colonies bactériennes issues des dépôts fécaux, on peut penser que la détection de ces bactéries dans l'eau est bien synonyme d'un risque sanitaire potentiel. Cependant, la contribution de ces populations naturalisées à la contamination du cours d'eau est mineure par rapport aux *E. coli* fécaux.

Intégrer l'ensemble des populations, majoritaires et minoritaires, a permis de discriminer les sols présentant principalement des populations d'*E. coli* naturalisées de ceux présentant également des populations fécales (Figures 47, 48 et 49). La mise en œuvre de la PCR-DGGE sur le gène *uidA* s'est révélée être un bon outil de traçage d'*E. coli* dans différents compartiments d'un bassin versant, permettant de caractériser la structure des populations à chaque étape de la chaîne de contamination de l'eau.

Notre étude concerne le comportement d'un indicateur de contamination fécale, *E. coli*, dans le cas d'une exploitation extensive d'un alpage en tête de bassin versant. Le fait

## Sol avec sous-sol imperméable, non oxygéné

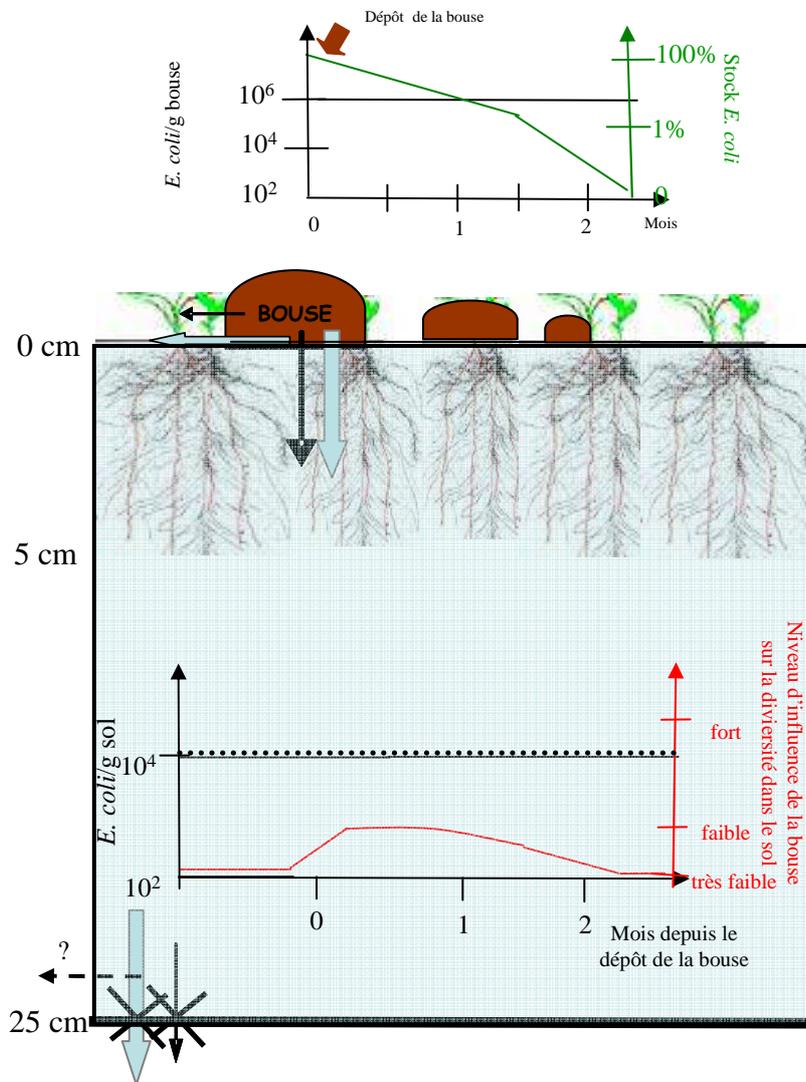


Figure 48 : Schéma fonctionnel du comportement d'*E. coli* dans la rhizosphère et le sous-sol de la station « *Rumex réduit* » du Bassin versant de l'Alpage de Bise. Les flèches noires indiquent les flux potentiels d'*E. coli*, les flèches horizontales le ruissellement et les flèches verticales le lessivage. Le graphique en vert représente les stocks en *E. coli* dans la bouse, le trait noir plein les concentrations en *E. coli* par g de sol de profondeur ou en pointillés noirs, les concentrations en *E. coli* par g de sol de surface. Les graphiques en rouge représentent le niveau d'influence de la bouse sur la structure des populations d'*E. coli* dans le sol. Des niveaux faibles à très faibles d'influence indiquent la présence de populations naturalisées au sol. Les flèches bleues représentent les mouvements d'eau et la bioturbation. Le nombre de cellules par g de sol indique la concentration d'*E. coli* au sein de chaque compartiment. La flèche marron indique le dépôt de la bouse.

d'utiliser cet indicateur global apporte des informations relatives aux risques potentiels de contamination fécale de l'eau. Le développement d'une démarche équivalente avec des germes pathogènes tels que *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* qui est ubiquitaire ou encore à des pathogènes opportunistes de l'homme comme *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* nous semble intéressant pour mieux rendre compte des risques sanitaires liés aux pratiques agricoles. D'ores et déjà, un travail portant sur la dispersion et la survie de populations d'*E. coli* productrices de shigatoxines a été conduit en parallèle à ce travail par B. Frémaux (2007). Les résultats acquis sont relatifs à la mise en évidence du transfert de ces pathogènes dans les sols drainants et sont convergents avec ceux obtenus dans le cadre de cette thèse. Ceci conduit à penser que le pâturage s'accompagne bien d'une dégradation de la qualité microbiologique de l'eau, synonyme d'un risque de transmission de maladie pour les hommes, voire aussi pour les animaux.

Comme précisé à plusieurs reprises dans ce manuscrit, la partie des travaux réalisés sur la détermination de l'état physiologique des bactéries dans les sols nécessite encore quelques mises au point. Disposer de techniques d'évaluation de l'état physiologique des bactéries fécales dans l'environnement autoriserait sans doute l'amélioration de nos connaissances concernant les différentes stratégies adaptatives et les modalités de naturalisation de certaines populations d'*E. coli*. Cela permettrait aussi de déduire dans quelle mesure les stratégies de colonisation de ces milieux se traduisent par une élévation des risques associés à la santé.

En terme d'évaluation des risques au sein des stations pastorales, une forte relation entre les populations présentes dans l'eau à l'exutoire, dans les bouses, et dans les sols où la circulation de l'eau est rapide a été mise en évidence. Le troupeau est le principal acteur de contamination de la rivière. On ne peut exclure la faune sauvage, mais sa contribution semble ici minoritaire. Les zones contributives potentielles correspondent aux zones où le troupeau a accès au réseau hydrographique du bassin versant, aux berges du cours d'eau et aux sols drainants. Adapter le circuit de pâturage ou interdire l'accès du troupeau à ces zones contributives, en instaurant des circuits fermés de pâturage et en installant des abreuvoirs par exemple, limiteraient cette pollution du cours d'eau. Cependant, pour implanter et mettre en œuvre ces alternatives, une analyse au cas par cas est indispensable. Il faut alors analyser sa faisabilité en fonction de la main d'œuvre nécessaire, des infrastructures de l'alpage ainsi que de la répartition de la biomasse végétale sur l'alpage. Une analyse globale du système pastoral

## Sol avec sous-sol oxygéné

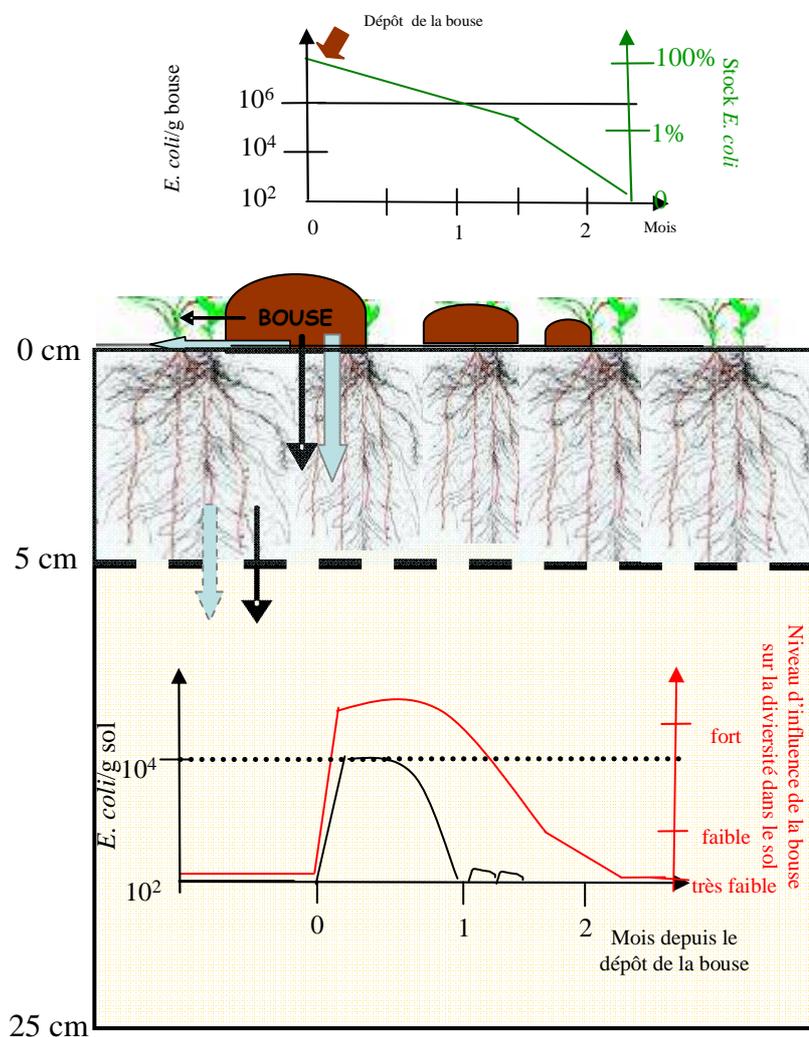


Figure 49 : Schéma fonctionnel du comportement d'*E. coli* dans la rhizosphère et le sous-sol de la station « *Rumex oxydé* » du Bassin versant de l'Alpage de Bise. Les flèches noires indiquent les flux potentiels d'*E. coli*, les flèches horizontales le ruissellement et les flèches verticales le lessivage. Le graphique en vert représente les stocks en *E. coli* dans la bouse, le trait noir plein les concentrations en *E. coli* par g de sol de profondeur ou en pointillés noirs, les concentrations en *E. coli* par g de sol de surface. Les graphiques en rouge représentent le niveau d'influence de la bouse sur la structure des populations d'*E. coli* dans le sol. Des niveaux faibles à très faibles d'influence indiquent la présence de populations naturalisées au sol. Les flèches bleues représentent les mouvements d'eau et la bioturbation. Le nombre de cellules par g de sol indique la concentration d'*E. coli* au sein de chaque compartiment. La flèche marron indique le dépôt de la bouse.

prenant en compte la spécificité de l'exploitation et du cadre physique dans lequel on veut intervenir nous semble primordiale.



## **Références bibliographiques**



## Références bibliographiques

- Abu-Ashour, J. & H. Lee, (2000) Transport of bacteria on sloping soil surfaces by runoff. *Environmental Toxicology* **15**: 149-153.
- Acido-Résistance STEC, (Projet ANR-05-PNRA-021 2005-2008) Analyse de la supériorité écologique conférée, par l'acido-résistance, à des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC), de la fourche à la fourchette.
- Adachi, K., M. Nakatani & H. Mochida, (2002) Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. *Soil Sci. Plant Nutrition* **48**: 889-895.
- AFNOR NF T 90-414, (1985) Essais des eaux. Recherche et dénombrement des coliformes et coliformes thermotolérants. Méthode générale par filtration sur membrane.
- AFNOR NF XP T90-433, (1992) Essais des eaux. Dénombrement des *Escherichia coli*. Méthode miniaturisée par ensemencement en milieu liquide (NPP). Qualité de l'Eau. Tome 4. Méthodes d'analyse 3. Analyse biochimique et biologique, analyse microbiologique, textes réglementaires.
- Aiso, T., H. Yoshida, A. Wada & R. Ohki, (2005) Modulation of mRNA stability participates in stationary-phase-specific expression in ribosome modulation factor. *J. Bacteriol.* **187**: 1951-1958.
- Alexander, M., (1981) Why microbial predators and parasites do not eliminate their prey and hosts. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 113-133.
- Allison G. E. and N. K. Verma, (2000) Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends Microbiol.* **8**: 17-23.
- Almiron, M., A. J. Link, D. Furlong & R. Kolter, (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **6**: 2646-2654.
- Altshul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman, (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Arias, M. E., J. A. Gonzales-Perez, F. J. Gonzales-Vila & A. S. Ball, (2005) Soil health- a new challenge for microbiologists and chemists. *Inter. Microbiol.* **8**: 13-21.
- Arnold, K. W. & C. W. Kaspar, (1995) Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2037-2039.
- Artz, R. R. E. & K. Killham, (2002) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in private drinking water wells: influences of protozoan grazing and elevated copper concentrations. *FEMS Microbiol. Lett.* **216**: 117-122.



- Artz, R. R. E., J. Townend, K. Brown, W. Towers & K. Killham, (2005) Soil macropores and compaction control the leaching potential of *Escherichia coli* O157:H7. *Environmental Microbiology* **7**: 241-248.
- Ashelford, K. E., M. J. Day & J. C. Fry, (2003) Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 285-289.
- Aslam, M., G. G. Greer, F. M. Nattress, C. O. Gill & L. M. McMullen, (2004) Genetic diversity of *Escherichia coli* recovered from the oral cavity of beef cattle and their relatedness to faecal *E. coli*. *Letters in Appl. Microbiology* **39**: 523-527.
- Aslam, M., F. Nattress, G. Greer, C. Yost, C. Gill & L. McMullen, (2003) Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2794-2799.
- Avery, S. M., A. Moore & M. L. Hutchison, (2004) Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. *Letters in Appl. Microbiology* **38**: 355-359.
- Aviv, M., H. Giladi, A. B. Oppenheim & G. Glaser, (1996) Analysis of the shut-off of ribosome RNA promoters in *Escherichia coli* upon entering the stationary phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**: 71-76.
- Azam, T. A., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda & A. Ishihama, (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* **181**: 6361-6370.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy & J. M. Vivanco, (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* **57**: 233-266.
- Balaban, N. Q., J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik & S. Leibler, (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**: 1622-1625.
- Balandreau, J., V. Viallard, B. Cournoyer, T. Coenye, S. Laevens & P. Vandamme, (2001) *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 982-985.
- Balesdent, J., C. Chenu & M. Balabane, (2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil Till. Res.* **53**: 215-230.
- Ball, C. A., R. Osuna, K. C. Ferguson & R. C. Johnson, (1992) Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 8043-8056.
- Barcina, I., J. M. Gonzalez, J. Iriberry & L. Egea, (1989) Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 246-251.
- Barker, J., T. J. Humphrey & M. W. R. Brown, (1999) Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**: 291-295.



- Barrio, G. d., B. Alvera, J. Puigdefabregas & C. Diez, (1997) Response of high mountain landscape to topographic variables : Central Pyrenees. *Landscape Ecol.* **12**: 95-115.
- Bej, A. K., J. L. DiCesare, L. Haff & R. M. Atlas, (1991a) Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1013-1017.
- Bej, A. K., S. C. McCarty & R. M. Atlas, (1991b) Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2429-2432.
- Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother & J. Harel, (2003) Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2113-2125.
- Beloin, C., J. Valle, P. Latour-Lambert, P. Faure, M. Kzreminski, D. Balestrino, J. A. J. Haagenen, S. Molin, G. Prensier, B. Arbeille & J.-M. Ghigo, (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* **51**: 659-674.
- Berg, G., L. Eberl & A. Hartmann, (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* **7**: 1673-1685.
- Bergsma-Vlami, M., M. E. Prins & J. M. Raaijmakers, (2005) Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 59-69.
- Bertani, G., (1951) Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 293-300.
- Bettelheim, K. A., A. Kuzevski, R. A. Gilbert, D. O. Krause & C. S. McSweeney, (2005) The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. *Journal of Appl. Microbiology* **98**: 699-709.
- Beven, K. & P. Germann, (1982) Macropores and water flow in soils. *Water Resour. Res.* **18**: 1311-1325.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau & Y. Shao, (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- Boaretti, M., M. del Mar Lleo, B. Bonato, C. Signoretto & P. Canepari, (2003) Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology* **5**: 986-996.



- Boes, J., L. Alban, J. Bagger, V. Mogelmose, D. L. Baggesen & J. E. Olsen, (2005) Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in slurry applied to clay soil on a Danish swine farm. *Preventive Vet. Med.* **69**: 213-228.
- Bogosian, G., L. E. Sammons, P. J. Morris, J. P. O'Neil, M. A. Heitkamp & D. B. Weber, (1996) Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4114-4120.
- Bokal Iv, A. J., W. Ross & R. L. Gourse, (1995) The transcriptional activator protein FIS: DNA interactions and cooperative interactions with RNA polymerase at the *Escherichia coli* *rrnBP1* promoter. *J. Mol. Biol.* **245**: 197-207.
- Bottero, M. T., A. Dalmasso, D. Soglia, S. Rosati, L. Decastelli & T. Civera, (2004) Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. *Mol. Cell. Probes* **18**: 283-288.
- Bower, P. A., C. O. Scopel, E. T. Jensen, M. M. Depas & S. L. McLellan, (2005) Detection of genetic markers of fecal indicator bacteria in Lake Michigan and determination of their relationship to *Escherichia coli* densities using standard microbiological methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8305-8313.
- Bradford, S. A. & J. Schijven, (2002) Release of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calf manure: Impact of solution salinity. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 3916-3923.
- Brasher, C. W., A. DePaola, D. D. Jones & A. K. Bej, (1998) Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. *Curr. Microbiol.* **37**: 101-107.
- Brenner, D., (1984) Recommendation on recent proposal for the classification of shigellae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 87-88.
- Brenner, J., G. Fanning, G. Miklos & A. Steigerwalt, (1973) Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 1-7.
- Brown, M. R. W., A. W. Smith, J. Barker, T. J. Humphrey & B. Dixon, (2002) *E. coli* O157 persistence in the environment. *Microbiol.* **148**: 1-2.
- Bruce, K. D., W. D. Hiorns, J. L. Hobman, A. M. Osborn, P. Strike & D. A. Ritchie, (1992) Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3413-3416.
- Buchan, A., M. Alber & R. E. Hodson, (2001) Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 313-321.
- Bunker, S., T. Bates & J. Oliver, (2004) Effects of temperature on detection of plasmid or chromosomally encoded *gfp*- and *lux*-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Environ. Biosafety Res.* **3**: 83-90.



- Burnett, S. L., J. Chen & L. R. Beuchat, (2000) Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4679-4687.
- Byappanahalli, M., M. Fowler, D. Shively & R. Whitman, (2003) Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a midwestern coastal stream. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4549-4555.
- Byappanahalli, M. & R. Fujioka, (2004) Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. *Water Sci. Technol.* **50**: 27-32.
- Byappanahalli, M. N. & R. S. Fujioka, (1998) Evidence that tropical soil environment can support the growth of *Escherichia coli*. *Water Sci. Technol.* **38** 171–174
- Byappanahalli, M. N., R. L. Whitman, D.A. Shively, M. J. Sadowsky & S. Ishii, (2006) Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environmental Microbiology* **8**: 504-513.
- Cam, K., A. Cuzange & J.-P. Bouché, (1995)  $\sigma^S$ -dependent overexpression of *ftsZ* in an *Escherichia coli* k12 *rpoB* mutant that is resistant to the division inhibitors DicB and DicF RNA. *Mol. Gen. Genet.* **248**: 190-194.
- Caruso, G., E. Crisafi & M. Mancuso, (2002) Development of an enzyme assay for rapid assessment of *Escherichia coli* in seawaters. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 548-556.
- Cassell, E., R. Kort, D. Meals, S. Aschmann, J. Dorioz & D. Anderson, (2001) Dynamic phosphorus mass balance modeling of large watersheds: long-term implications of management strategies. *Water Sci. Technol.* **43**: 153-162.
- Castanie-Cornet, M.-P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott & J. W. Foster, (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 3525-3535.
- Castresana, J., (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 540-552.
- Cebula, T. A., W. L. Payne & P. Feng, (1995) Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 248-250.
- Celico, F., I. Musilli & G. Naclerio, (2004) The impacts of pasture- and manure-spreading on microbial groundwater quality in carbonate aquifers. *Environ. Geol.* **46**: 233-236.
- Chandler, D. & J. Craven, (1980) Relationship of soil moisture to survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in soils. *Aust. J. Agr. Res.* **31**: 547–555.
- Chandler, D. S., I. Farran & J. A. Craven, (1981) Persistence and distribution of pollution indicator bacteria on land used for disposal of piggery effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 453-460.



- Chang, D.-E., D. J. Smalley & T. Conway, (2002) Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol. Microbiol.* **45**: 289-306.
- Charkowski, A. O., J. D. Barak, C. Z. Sarreal & R. E. Mandrell, (2002) Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on Alfalfa sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3114-3120.
- Chen, H., G. Ponniah, N. Salonen & P. Blum, (2004) Culture-independent analysis of fecal enterobacteria in environmental samples by single-cell mRNA profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4432-4439.
- Cheville, A. M., K. W. Arnold, C. Buchrieser, C. M. Cheng & C. W. Kaspar, (1996) *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1822-1824.
- Chiarini, L., S. Tabacchioni & A. Bevivino, (1993) Interactions between rhizosphere microorganisms under iron limitation. *Arch. Microbiol.* **160**: 68-73.
- Choi, S. H., D. J. Baumler & C. W. Kaspar, (2000) Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3911-3916.
- Cilia, V., B. Lafay & R. Christen, (1996) Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 451-461.
- Clermont, O., S. Bonacorsi & E. Bingen, (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4555-4558.
- Collins, R. & K. Rutherford, (2004) Modelling bacterial water quality in streams draining pastoral land. *Water Res.* **38**: 700-712.
- Cooley, M. B., W. G. Miller & R. E. Mandrell, (2003) Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4915-4926.
- Cools, D., R. Merckx, K. Vlassak & J. Verhaegen, (2001) Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Appl. Soil Ecol.* **17**: 53-62.
- Corona-Izquierdo, F. P. & J. Membrillo-Hernandez, (2002) A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **211**: 105-110.
- Craig, D. L., H. J. Fallowfield & N. J. Cromar, (2002) Enumeration of faecal coliforms from recreational coastal sites: evaluation of techniques for the separation of bacteria from sediments. *Journal of Appl. Microbiology* **93**: 557-565.



- Crane, S. R., J. A. Moore, M. E. Grismer & J. R. Miner, (1983) Bacterial pollution from agricultural sources: A review. *Trans. ASAE* **26**: 858-866.
- Cray, W. C., Jr., T. A. Casey, B. T. Bosworth & M. A. Rasmussen, (1998) Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1975-1979.
- Cronin, D., Y. Moënne-Loccoz, A. Fenton, C. Dunne, D. N. Dowling & F. O'Gara, (1997) Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 95-106.
- Crump, B. C., J. A. Baross & C. A. Simenstad, (1998) Dominance of particle-attached bacteria in the Columbia River estuary, USA. *Aqu. Microbiol. Ecol.* **14**: 7-18.
- Cuny, C., L. Dukan, L. Fraysse, M. Ballesteros & S. Dukan, (2005) Investigation of the first events leading to loss of culturability during *Escherichia coli* starvation: future nonculturable bacteria form a subpopulation. *J. Bacteriol.* **187**: 2244-2248.
- Dai, K. & J. Lutkenhaus, (1991) *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 3500-3506.
- Danese, P. N., L. A. Pratt, S. L. Dove & R. Kolter, (2000) The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* **37**: 424-432.
- Dauga, C., (2002) Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 531-547.
- Davenport, C. V., E. B. Sparrow & R. C. Gordon, (1976) Fecal indicator bacteria persistence under natural conditions in an ice-covered river. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**.
- Davies, C., J. Long, M. Donald & N. Ashbolt, (1995) Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1888-1896.
- Dazzo, F., P. Smith & D. Hubbell, (1973) The influence of manure slurry irrigation on the survival of fecal organisms in Scranton fine sand. *J. Environ. Qual.* **2**: 470-473.
- DeLisa, M. P., C.-F. Wu, L. Wang, J. J. Valdes & W. E. Bentley, (2001) DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 5239-5247.
- Desjardins, P., B. Picard, B. Kaltenböck, J. Elion & E. Denamurl, (1995) Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism. *J. Mol. Evol.* **41**: 440-448.



- Desmarais, T. R., H. M. Solo-Gabriele & C. J. Palmer, (2002) Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1165-1172.
- Desnues, B., C. Cuny, G. Grégori, S. Dukan, H. Aguilaniu & T. Nyström, (2003) Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO reports* **4**: 400-404.
- Dewettinck, T., W. Hulsbosch, K. V. Hege, E. M. Top & W. Verstraete, (2001) Molecular fingerprinting of bacterial populations in groundwater and bottled mineral water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 412-418.
- Dommergues, Y. & F. Mangenot, (1970) *Ecologie microbienne du sol*, p. 796. Masson et Cie, Paris.
- Dong, Y., A. L. Iniguez, B. M. M. Ahmer & E. W. Triplett, (2003) Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1783-1790.
- Dorioz, J. M., E. A. Cassell, A. Orand & K. G. Eisenman, (1998) Phosphorus storage, transport and export dynamics in the Foron river watershed. *Hydrol. Processes* **12**: 285-309.
- Dorioz, J. M. & J. P. Party, (1987) Dynamique écologique et typologie de territoires pastoraux des Alpes du Nord - Analyse de l'organisation agro-écologique d'un alpage de référence. *Acta Oecol.* **8**: 257-280.
- Dove, S. L. & A. Hochschild, (1998) Conversion of the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target. *Genes Dev.* **12**: 745-754.
- Doyle, M. P. & J. L. Schoeni, (1984) Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 855-856.
- DRASS-Rhône-Alpes, (2005) Bilan de la qualité de l'eau potable distribuée en 2005 des bassins rhône-méditerranée et Corse. pp. 30.
- Drevet, J., (2004) Etude hydrogéologique du bassin versant de la montagne de Bise. In. Chambéry: IUP Montagne, Université de Chambéry, pp. 56.
- Dubos, R., W. R. Schaedler, R. Costello & P. Hoet., (1965) Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **122**.
- Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventré, J. Elion, B. Picard & E. Denamur, (2001) Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol.* **147**: 1671-1676.



- Edwards, P. R. & W. H. Ewing, (1972) *Identification of enterobacteriaceae*, p. 362. Burgess Publishing Company, Georgia. US.
- Edwards, T., (2003) Best management practices aimed at reducing summer microbial loading to rivers from agricultural sources : a review. In. Aberdeen: Scottish executive, pp. 27.
- Egamberdieva, D., F. Kamilova, S. Validov, L. Gafurova, Z. Kucharova & B. Lugtenberg, (2008) High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology*.
- El-Sharoud, W. M. & G. W. Niven, (2005) The activity of ribosome modulation factor during growth of *Escherichia coli* under acidic conditions. *Arch. Microbiol.*
- Ellis, J. R. & T. M. McCalla, (1978) Fate of pathogens in soils receiving animal wastes. *Trans. ASAE* **21**: 309-313.
- England, L. S., H. Lee & J. T. Trevors, (1993) Bacterial survival in soil: effect of clays and protozoa. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 525-531.
- Entry, J. A. & N. Farmer, (2001) Movement of coliform bacteria and nutrients in ground water flowing through basalt and sand aquifers. *J. Environ. Qual.* **30**: 1533-1539.
- Escobar-Páramo, P., C. Giudicelli, C. Parsot & E. Denamur, (2003) The evolutionary history of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. *J. Mol. Evol.* **57**: 140-148.
- Escobar-Paramo, P., A. Sabbagh, P. Darlu, O. Pradillon, C. Vaury, E. Denamur & G. Lecointre, (2004) Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: the *Escherichia coli* case study. *Mol. Phylogen. Evol.* **30**: 243-250.
- Estrada, I. B., A. Aller, F. Aller, X. Gómez & A. Morán, (2004) The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* **93**: 191-198.
- Falla, T. J. & I. Chopra, (1998) Joint tolerance to  $\beta$ -lactam and fluoroquinolone antibiotics in *Escherichia coli* results from overexpression of *hipA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 3282-3284.
- Farnleitner, A. H., L. Hocke, C. Beiwl, G. C. Kavka, T. Zechmeister, A. K. T. Kirschner & R. L. Mach, (2001) Rapid enzymatic detection of *Escherichia coli* contamination in polluted river water. *Letters in Appl. Microbiology* **33**: 246-250.
- Farnleitner, A. H., L. Hocke, C. Beiwl, G. G. Kavka & R. L. Mach, (2002) Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -glucuronide in differing sample fractions of river waters and its implication for the detection of fecal pollution. *Water Res.* **36**: 975-981.
- Farnleitner, A. H., N. Kreuzinger, G. G. Kavka, S. Grillenberger, J. Rath & R. L. Mach, (2000) Simultaneous detection and differentiation of *Escherichia coli* populations from environmental freshwaters by means of sequence variation in a fragment of the  $\beta$ -D-glucuronidase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1340-1346.



- Faust, M. A., (1982) Relationship between land-use practices and fecal bacteria in soils. *J. Environ. Qual.* **11**: 141-146.
- Faust, M. A., A. E. Aotaky & M. T. Hargadon, (1975) Effect of physical parameters on the *in situ* survival of *Escherichia coli* MC-6 in an estuarine environment. *Appl. Microbiol.* **30**: 800-806.
- Favre-Bonte, S., L. Ranjard, C. Colinon, C. Prigent-Combaret, S. Nazaret & B. Cournoyer, (2005) Freshwater selenium-methylating bacterial thiopurine methyltransferases: diversity and molecular phylogeny. *Environmental Microbiology* **7**: 153-164.
- Felsenstein, J., (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- Feng, P., R. Lum & G. W. Chang, (1991) Identification of *uidA* gene sequences in  $\beta$ -D-glucuronidase-negative *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 320-323.
- Feng, P. C. & P. A. Hartman, (1982) Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1320-1329.
- Fenlon, D., I. Ogden, A. Vinten & I. Svoboda, (2000) The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **29**: 149S-156S.
- Ferreira, A., L. Rendano, M. Wiedmann & K. J. Boor, (1999) Characterization of *rpoS* alleles in *Escherichia coli* O157:H7 and in other *E. coli* serotypes. *Journal of Appl. Microbiology* **86**: 295-301.
- Fiksdal, L., M. Pommepuy, M. P. Caprais & I. Midttun, (1994) Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1581-1584.
- Filutowicz, M., W. Ross, J. Wild & R. L. Gourse, (1992) Involvement of Fis protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 398-407.
- Fischer, C. R., M. Yoichi, H. Unno & Y. Tanji, (2004) The coexistence of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and its specific bacteriophage in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **241**: 171-177.
- Fisher, D. S., J. L. Steiner, D. M. Endale, J. A. Stuedemann, H. H. Schomberg, A. J. Franzluebbbers & S. R. Wilkinson, (2000) The relationship of land use practices to surface water quality in the Upper Oconee Watershed of Georgia. *Forest Ecol. Manage.* **128**: 39-48.
- Foppen, J. W. A. & J. F. Schijven, (2006) Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. *Water Res.* **40**: 401-426.



- Foster, R. C., (1986) The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopath.* **24**: 211.
- Franz, E., A. D. van Diepeningen, O. J. de Vos & A. H. C. van Bruggen, (2005) Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in manure, manure-amended soil, and Lettuce. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6165-6174.
- Frémaux, B., (2007) Ecologie des *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC) dans les effluents d'élevages bovins et dans le sol. In.: Université Claude Bernard Lyon1, pp. 320.
- Frémaux, B., C. Prigent-Combaret & C. Vernozy-Rozand, (sous presse) Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Vet Microbiol.*
- Fukushima, M., K. Kakinuma & R. Kawaguchi, (2002) Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J. Clinical Microbiol.* **40**: 2779-2785.
- Gagliardi, J. V. & J. S. Karns, (2000) Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 877-883.
- Galtier, N., M. Gouy & C. Gautier, (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 543-548.
- Garcia-Armisen, T., P. Lebaron & P. Servais, (2005)  $\beta$ -D-glucuronidase activity assay to assess viable *Escherichia coli* abundance in freshwaters. *Letters in Appl. Microbiology* **40**: 278-282.
- Garrido, T., M. Sánchez, P. Palacios, M. Aldea & M. Vicente, (1993) Transcription of *ftsZ* oscillates during the cell cycle of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**: 3957-3965.
- Garrity, G. M., M. Winters, A. W. Kuo & D. B. Searles, (2002) *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*. Bergey's manual of systematic bacteriology, Springer-Verlag NY.
- Genevaux, P., S. Muller & P. Bauda, (1996) A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**: 27-30.
- Gentry, D. R. & R. R. Burgess, (1986) The cloning and sequence of the gene encoding the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Gene* **48**: 33-40.
- Gentry, D. R., V. J. Hernandez, L. H. Nguyen, D. B. Jensen & M. Cashel, (1993) Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* **175**: 7982-7989.
- George, I., A. Anzil & P. Servais, (2004) Quantification of fecal coliform inputs to aquatic systems through soil leaching. *Water Res.* **38**: 611-618.



- George, I., P. Crop & P. Servais, (2001) Use of  $\beta$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewater. *Can. J. Microbiol.* **47**: 670-675.
- George, I., P. Crop & P. Servais, (2002) Fecal coliform removal in wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods. *Water Res.* **36**: 2607-2617.
- George, I., M. Petit & P. Servais, (2000) Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 404-413.
- Gerba, C. P., J. L. Melnick & C. Wallis, (1975) Fate of wastewater bacteria and viruses in soil. *J. Irrig. Drain. Div.* **101**: 157-174.
- Gerdes, K., S. K. Christensen & A. Lobner-Olesen, (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 371-382.
- Ghebru, H., (1988) Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. *Mémoire de maîtrise et Sciences Vétérinaires en Microbiologie Immunologie, Nantes*.
- Ghigo, J.-M., (2003) Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Res. Microbiol.* **154**: 1-8.
- Gobat, J., M. Aragno & W. Matthey, (1998) *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*.
- Golovlev, E. L., (2001) Ecological strategy of bacteria: specific nature of the problem. *Microbiol.* **70**: 379-383.
- Gonzalez-Gil, G., P. Bringmann & R. Kahmann, (1996) FIS is a regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **22**: 21-29.
- Gordon, D. M., (2001) Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiol.* **147**: 1079-1085.
- Gordon, D. M., S. Bauer & J. R. Johnson, (2002) The genetic structure of *Escherichia coli* populations in primary and secondary habitats. *Microbiol.* **148**: 1513-1522.
- Gosink, K. K., W. Ross, S. Leirmo, R. Osuna, S. E. Finkel, R. C. Johnson & R. L. Gourse, (1993) DNA binding and bending are necessary but not sufficient for Fis-dependent activation of *rrnB* P1. *J. Bacteriol.* **175**: 1580-1589.
- Greatorex, J. S. & G. M. Thorne, (1994) Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1172-1178.
- Green, D. H., G. D. Lewis, S. Rodtong & M. W. Loutit, (1991) Detection of faecal pollution In water by an *Escherichia coli uidA* gene probe *J. Microbiol. Meth.* **13**: 207-214.



- Greenberg, A. F., L. S. Clescerl & A. D. Eaton, (1992) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Am. Public Health Assoc., Washington DC.
- Griffiths, R. S. & I. M. Young, (1994) The effects of soil structure on protozoa in a clay-loam soil. *European Journal of Soil Science* **45**: 285-292.
- Grimont, P., (1987) Taxonomie des *Escherichia*. *Méd. Mal. Infect.* **17**: 6-10.
- Guber, A. K., Y. A. Pachepsky, D. R. Shelton & O. Yu, (2007) Effect of bovine manure on fecal coliform attachment to soil and soil particles of different sizes. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3363-3370.
- GuidA, L., Z. Saidi, M. N. Hughes & R. K. Poole, (1991) Aluminium toxicity and binding to *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **156**: 507-512.
- Guindon, S. & O. Gascuel, (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696-704.
- Hagedorn, C., D. T. Hansen & G. H. Simonson, (1978) Survival and movement of fecal indicator bacteria in soil under conditions of saturated flow. *J. Environ. Qual.* **7**: 55-59.
- Hansen, W. & E. Yourassowsky, (1984) Detection of  $\beta$ -glucuronidase in lactose-fermenting members of the family *Enterobacteriaceae* and its presence in bacterial urine cultures. *J Clin Microbiol.* **20**: 1177-1179.
- Hardina, C. M. & R. S. Fujioka, (1991) Soil: The environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's streams. *Environ. Tox. Water Qual.* **6**: 185-195.
- Hartel, P. G., J. D. Summer & W. I. Segars, (2003) Deer diet affects ribotype diversity of *Escherichia coli* for bacterial source tracking. *Water Res.* **37**: 3263-3268.
- Hartmann, P. A., (1989) The MUG (Glucuronidase) test for *Escherichia coli* in food and water, p. 290–308. *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*.
- Hasegawa, M., H. Kishino & T.-A. Yano, (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**: 160 - 174.
- Hattori, T., (1969) Fractionation of microbial cells in soil aggregates. *Soil Biol.* **11**: 30-31.
- Hattori, T. & R. Hattori, (1976) The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* **4**: 423-461.
- Hauben, L., E. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck & J. Swings, (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 384-397.
- Heijnen, C. E. & J. A. Veen, (1991) A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **85**: 73-80.



- Hengge-Aronis, R., (1993) Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **72**: 165-168.
- Henschke, R. B. & F. R. J. Schmidt, (1990) Plasmid mobilization from genetically engineered bacteria to members of the indigenous soil microflora in situ. *Curr. Microbiol.* **20**: 105-110.
- Hernandez, J. F., J. M. Guibert, J. M. Delattre, C. Oger, C. Charrière, B. Hugues, R. Serceau & F. Sinegre, (1991) Evaluation of miniaturized procedure for enumeration of *Escherichia coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4-methylumbelliferyl-D-glucuronide. *Water Res.* **25**: 1073-1078.
- Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye & T. S. Whittam, (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 6175-6181.
- Hommais, F., S. Pereira, C. Acquaviva, P. Escobar-Paramo & E. Denamur, (2005) Single-nucleotide polymorphism phylotyping of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4784-4792.
- Hubbard, R. K., G. L. Newton & G. M. Hill, (2004) Water quality and the grazing animal. *J. Anim Sci.* **82**: E255-263.
- Igarashi, K., N. Fujita & A. Ishihama, (1989) Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: omega factor is responsible for the ppGpp sensitivity. *Nucl. Acids Res.* **17**: 8755-8765.
- Ishihama, A., (1997) Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. *Curr. Opin. Gene. Dev.* **7**: 582-588.
- Ishihama, A., (1999) Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes Cells* **4**: 135-143.
- Ishii, S., W. B. Ksoll, R. E. Hicks & M. J. Sadowsky, (2006) Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior Watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 612-621.
- Itoh, Y., Y. Sugita-Konishi, F. Kasuga, M. Iwaki, Y. Hara-Kudo, N. Saito, Y. Noguchi, H. Konuma & S. Kumagai, (1998) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in Radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1532-1535.
- Izutsu, K., A. Wada & C. Wada, (2001) Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes Cells* **6**: 665-676.
- Jamieson, R. C., R. J. Gordon, K. E. Sharples, G. W. Stratton & A. Madani, (2002) Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water : a review. *Can. biosys. eng.* **44**.



- Jarvis, G. N., M. G. Kizoulis, F. Diez-Gonzalez & J. B. Russell, (2000) The genetic diversity of predominant *Escherichia coli* strains isolated from cattle fed various amounts of hay and grain. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**: 225-233.
- Jefferson, R. A., S. M. Burgess & D. Hirsh, (1986)  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 8447-8451.
- Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall & J. B. Kaper, (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 7839-7843.
- Joergensen, R. G., H. Kuntzel, S. Scheu & D. Seitz, (1998) Movement of faecal indicator organisms in earthworm channels under a loamy arable and grassland soil. *Appl. Soil Ecol.* **8**: 1-10.
- Johnson, L. K., M. B. Brown, E. A. Carruthers, J. A. Ferguson, P. E. Dombek & M. J. Sadowsky, (2004) Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of *Escherichia coli* from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4478-4485.
- Jones, D. L., (1999) Potential health risks associated with the persistence of *Escherichia coli* O157 in agricultural environments. *Soil Use Manag.* **15**: 76-83.
- Juck, D., J. Ingram, M. Prévost, J. Coallier & C. Greer, (1996) Nested PCR protocol for the rapid detection of *Escherichia coli* in potable water. *Can. J. Microbiol.* **42**: 862-866.
- Kämpfer, P., O. Rauhoff & W. Dott, (1991) Glycosidase profiles of members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* **29**: 2877-2879.
- Kanamaru, K., K. Kanamaru, I. Tatsuno, T. Tobe & C. Sasakawa, (2000) SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **38**: 805-816.
- Kaper, J. B., (2005) Pathogenic *Escherichia coli*. *Inter. J. Med. Microbiol.* **295**: 355-356.
- Kay, D., M. Aitken, J. Crowther, I. Dickson, A. C. Edwards, C. Francis, M. Hopkins, W. Jeffrey, C. Kay, A. T. McDonald, D. McDonald, C. M. Stapleton, J. Watkins, J. Wilkinson & M. D. Wyer, (2007) Reducing fluxes of faecal indicator compliance parameters to bathing waters from diffuse agricultural sources: The Brighthouse Bay study, Scotland. *Environ. Pollut.* **147**: 138-149.
- Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville & U. Burger, (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant-Microbe Interact* **5**: 4-13.
- Kell, D. B., A. S. Kaprelyants, D. H. Weichart, C. R. Harwood & M. R. Barer, (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 169-187.



- Kemper, W. D. & R. C. Rosenau, (1986) Aggregate stability and size distribution. *Soil chem. physics* **9**: 425-442.
- Keren, I., N. Kaldalu, A. Spoering, Y. Wang & K. Lewis, (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 13-18.
- Kilian, M. & P. Bulow, (1976) Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. In: *Acta. Pathol. Microbiol.*, pp. 245-251.
- Kim, S.-B. & M. Y. Corapcioglu, (2002) Contaminant transport in dual-porosity media with dissolved organic matter and bacteria present as mobile colloids. *J. Contam. Hydrol.* **59**: 267-289.
- 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.
- King, E., M. Ward & D. Raney, (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* **44**: 301-307.
- King, T. & T. Ferenci, (2005) Divergent roles of RpoS in *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **244**: 323-327.
- Kogure, K. & E. Ikemoto, (1997) Wide occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in natural freshwater environment. *Nippon Saikingaku Zasshi* **52**: 601-607.
- Kudva, I. T., K. Blanch & C. J. Hovde, (1998) Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3166-3174.
- Kudva, I. T., C. W. Hunt, C. J. Williams, U. M. Nance & C. J. Hovde, (1997) Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3878-3886.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen & M. Nei, (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.
- Lange, R., D. Fischer & R. Hengge-Aronis, (1995) Identification on transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 4676-4680.
- Lange, R. & R. Hengge-Aronis, (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 49-59.
- Lange, R. & R. Hengge-Aronis, (1994) The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* **8**: 1600-1612.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson & D. G. Higgins, (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.



- Lasalde, C., R. Rodriguez, H. H. Smith & G. Toranzos, (2005) Heterogeneity of *uidA* gene in environmental *Escherichia coli* populations. *J. Water Health* **3**: 297-304.
- Lecointre, G., L. Rachdi, P. Darlu & E. Denamur, (1998) *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol. Biol. Evol* **15**: 1685-1695.
- Lee, C. M. & R. Wall, (2006) Cow-dung colonization and decomposition following insect exclusion. *Bull. Entomol. Res.* **96**: 315-322.
- Levine, M. M., (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. . *J. Inf. Dis.* **155**: 377-389.
- Lewis, K., (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem. (Moscow)* **70**: 267-274.
- Liang, W.-J., K. J. Wilson, H. Xie, J. Knol, S. i. Suzuki, N. G. Rutherford, P. J. F. Henderson & R. A. Jefferson, (2005) The *gusBC* genes of *Escherichia coli* encode a glucuronide transport system. *J. Bacteriol.* **187**: 2377-2385.
- Lipson, D. A. & S. K. Schmidt, (2004) Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2867-2879.
- Lipson, D. A., S. K. Schmidt & R. K. Monson, (1999) Links between microbial population dynamics and nitrogen availability in an alpine ecosystem. *Ecol.* **80**: 1623-1631.
- Liu, B., M. L. Gumpertz, S. Hu & J. B. Ristaino, (2007) Long-term effects of organic and synthetic soil fertility amendments on soil microbial communities and the development of southern blight. *Soil Biol. Biochem.* **39**: 2302-2316.
- Lloyd, A. T. & P. M. Sharp, (1993) Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. *J. Mol. Evol.* **37**: 399-407.
- Loewen, P. C., B. Hu, J. Strutinsky & R. Sparling, (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **44**: 707-717.
- Lomovskaya, O. L., J. P. Kidwell & A. Matin, (1994) Characterization of the  $\sigma^{38}$ -dependent expression of a core *Escherichia coli* starvation gene, *pexB*. *J. Bacteriol.* **176**: 3928-3935.
- Lonetto, M. A. & C. A. Gross, (1996) *Nomenclature of sigma factors from Escherichia coli and Salmonella typhimurium and relationships to sigma factors from other organisms*, p. 821. ASM Press, Washington, D.C.
- Mainil, J., (2003) Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*. I) Les adhésines et facteurs de colonisation. *J. Ann. Méd. Vét.* **147**: 105-126.



- Makino, S.-I., T. Kii, H. Asakura, T. Shirahata, T. Ikeda, K. Takeshi & K. Itoh, (2000) Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5536-5539.
- Makinoshima, H., A. Nishimura & A. Ishihama, (2002) Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Mol. Microbiol.* **43**: 269-279.
- Mallik, P., T. S. Pratt, M. B. Beach, M. D. Bradley, J. Undamatla & R. Osuna, (2004) Growth phase-dependent regulation and stringent control of *fis* are conserved processes in enteric bacteria and involve a single promoter (*fis* P) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**: 122-135.
- Manafi, M., W. Kneifel & S. Bascomb, (1991) Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **55**: 335-348.
- Marsh, P. & E. M. H. Wellington, (1994) Phage-host interactions in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**: 99-107.
- Martins, M. T., I. G. Rivera, D. L. Clark, M. H. Stewart, R. L. Wolfe & B. H. Olson, (1993) Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of  $\beta$ -glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide media. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2271-2276.
- Mawdsley, J. L., R. D. Bardgett, R. J. Merry, B. F. Pain & M. K. Theodorou, (1995) Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Applied Soil Ecology* **2**: 1-15.
- Mbengue, M., E. Tine, E. Assih, L. Casalot, M. Drancourt, M. Labat & A. Samb, *Escherichia senegalensis* sp. nov., an aromatic-degrading facultative-anaerobic bacterium isolated from tropical millet brans. *Unpublished*.
- McCann, M. P., C. D. Fraley & A. Matin, (1993) The putative sigma factor KatF is regulated posttranscriptionally during carbon starvation. *J. Bacteriol.* **175**: 2143-2149.
- McDaniels, A., E. Rice, A. Reyes, C. Johnson, R. Haugland & G. Stelma, Jr, (1996) Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and  $\beta$ -D-glucuronidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3350-3354.
- McDougald, D., S. A. Rice, D. Weichart & S. Kjelleberg, (1998) Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 1-9.
- McGee, P., D. J. Bolton, J. J. Sheridan, B. Earley & N. Leonard, (2001) The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in slurry from cattle fed different diets. *Letters in Appl. Microbiology* **32**: 152-155.
- McGrady, M. H., (1915) The numerical interpretation of fermentation tube results. *J. Inf. Dis.* **17**: 183-212.



- McInerney, M. J., (1991) Use of models to predict bacterial penetration and movement within a subsurface matrix. In: Modeling the environmental fate of microorganisms. C. J. Hurst (ed). Oklahoma: Washington, DC : American Society for Microbiology, pp. 292.
- McLellan, S. L., A. D. Daniels & A. K. Salmore, (2003) Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2587-2594.
- Meays, C. L., (2006) Bacterial source tracking and survival of *Escherichia coli*. In: Dept. Biol.: University of Victoria, pp. 154.
- Meays, C. L., K. Broersma, R. Nordin & A. Mazumder, (2004) Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *J. Environ. Manag.* **73**: 71-79.
- Meyer, A. F., D. A. Lipson, A. P. Martin, C. W. Schadt & S. K. Schmidt, (2004) Molecular and metabolic characterization of cold-tolerant alpine soil *Pseudomonas sensus stricto*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 483-489.
- Milkman, R., (1997) Recombination and population structure in *Escherichia coli*. *Genetics* **146**: 745-750.
- Mizunoe, Y., S. N. Wai, A. Takade & S.-i. Yoshida, (1999) Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-degrading compounds. *Arch. Microbiol.* **172**: 63-67.
- Moberg, L., M. Wagner & L. Kellen, (1988) Fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in chilled and frozen foods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**: 589-602.
- Monday, S. R., T. S. Whittam & P. C. H. Feng, (2001) Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of  $\beta$ -Glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Inf. Dis.* **184**: 918-921.
- Mubiru, D. N., M. S. Coyne & J. H. Grove, (2000) Mortality of *Escherichia coli* O157:H7 in two soils with different physical and chemical properties. *J. Environ. Qual.* **29**: 1821-1825.
- Muffler, A., M. Barth, C. Marschall & R. Hengge-Aronis, (1997) Heat shock regulation of  $\sigma^s$  turnover: a role for DnaK and relationship between stress response mediated by  $\sigma^s$  and  $\sigma^{32}$  in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 445-452.
- Muirhead, R. W., R. P. Collins & P. J. Bremer, (2005) Erosion and subsequent transport state of *Escherichia coli* from cowpats. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2875-2879.
- Muirhead, R. W., R. P. Collins & P. J. Bremer, (2006a) The association of *E. coli* and soil particles in overland flow. *Water Sci. Technol.* **54**: 153-159.



- Muirhead, R. W., R. P. Collins & P. J. Bremer, (2006b) Interaction of *Escherichia coli* and soil particles in runoff. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3406-3411.
- Muirhead, R. W., R. P. Collins & P. J. Bremer, (2006c) Numbers and transported state of *Escherichia coli* in runoff direct from fresh cowpats under simulated rainfall. *Letters in Appl. Microbiology* **42**: 83-87.
- Muyzer, G., E. C. de Waal & A. G. Uitterlinden, (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Na, S., K. Miyanaga, H. Unno & Y. Tanji, (2006) The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**: 386-392.
- Nei, M. & T. Gojobori, (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* **3**: 418-426.
- Nelson, K. & R. K. Selander, (1992) Evolutionary genetics of the proline permease gene (*putP*) and the control region of the proline utilization operon in populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 6886-6895.
- Newlands, J. T., C. A. Josaitis, W. Ross & R. L. Gourse, (1992) Both *fis*-dependent and factor-independent upstream activation of the *rrnB* P1 promoter are face of the helix dependent. *Nucl. Acids Res.* **20**: 719-726.
- Nilsson, L., H. Verbeek, E. Vijgenboom, C. van Drunen, A. Vanet & L. Bosch, (1992) FIS-dependent trans activation of stable RNA operons of *Escherichia coli* under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **174**: 921-929.
- Niven, G. W., (2004) Ribosome modulation factor protects *Escherichia coli* during heat stress, but this may not be dependent on ribosome dimerisation. *Arch. Microbiol.* **182**: 60-66.
- Notley, L. & T. Ferenci, (1996) Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: what level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* **178**: 1465-1468.
- Novel, G. & M. Novel, (1973) Mutants of *E. coli* K12 unable to grow on methyl- $\beta$ -D-glucuronide: Map location of *uidA*. Locus of the structural gene of  $\beta$ -D-glucuronidase. *Mol. Gen. Genet.* **120**.
- Ogden, I. D., N. F. Hepburn, M. MacRae, N. J. C. Strachan, D. R. Fenlon, S. M. Rusbridge & T. H. Pennington, (2002) Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Letters in Appl. Microbiology* **34**: 100-104.
- Oliver, D., C. Clegg, A. Heathwaite & P. Haygarth, (2007) Preferential attachment of *Escherichia coli* to different particle size fractions of an agricultural grassland soil. *Water Air Soil Pollut.* **185**: 369-375.



- Oliver, D. M., C. D. Clegg, P. M. Haygarth & A. L. Heathwaite, (2005a) Assessing the potential for pathogen transfer from grassland soils to surface waters. *Adv. Agron.* **85**: 125-180.
- Oliver, D. M., L. Heathwaite, P. M. Haygarth & C. D. Clegg, (2005b) Transfer of *Escherichia coli* to water from drained and undrained grassland after grazing. *J. Environ. Qual.* **34**: 918-925.
- Oliver, J., (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **43**: 93-100.
- Oliver, J. D. & R. Bockian, (1995) In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2620-2623.
- Orskov, F. & I. Orskov, (1984) Serotyping of *Escherichia coli*. *Meth. Microbiol.* **14**.
- Orskov, F. & I. Orskov, (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* **38**: 699-704.
- Parveen, S., R. L. Murphree, L. Edmiston, C. W. Kaspar, K. M. Portier & M. L. Tamplin, (1997) Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2607-2612.
- Patten, C. L., M. G. Kirchhof, M. R. Schertzberg, R. A. Morton & H. E. Schellhorn, (2004) Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Geno.* **V272**: 580-591.
- Petit, M., I. George & P. Servais, (2000) Survival of *Escherichia coli* in freshwater :  $\beta$ -D-glucuronidase activity measurements and characterization of cellular states. *Can. J. Microbiol.* **46**: 679-684.
- Porter, J., C. Edwards & R. W. Pickup, (1995) Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *Journal of Applied Microbiology* **79**: 399-408.
- Pourcher, A. M., (1991) Contribution à l'étude de l'origine (humaine ou animale) de la contamination fécale des eaux de surface. In. Lille: Université des sciences et techniques de Lille Flandres Artois, pp. 176.
- Pratt, L. A. & R. Kolter, (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**: 285-293.
- Prosser, J. I., B. J. M. Bohannan, T. P. Curtis, R. J. Ellis, M. K. Firestone, R. P. Freckleton, J. L. Green, L. E. Green, K. Killham, J. J. Lennon, A. M. Osborn, M. Solan, C. J. van der Gast & J. P. W. Young, (2007) The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 384-392.



- Pupo, G. M., D. K. Karaolis, R. Lan & P. R. Reeves, (1997) Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infect. Immun.* **65**: 2685-2692.
- Pupo, G. M., R. Lan, P. R. Reeves & P. R. Baverstock, (2000) Population genetics of *Escherichia coli* in a natural population of native Australian rats. *Environmental Microbiology* **2**: 594-610.
- Rao, N. N. & A. Kornberg, (1996) Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary- phase *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 1394-1400.
- Rattray, E. A., J. I. Prosser, L. A. Glover & K. Killham, (1995) Characterization of rhizosphere colonization by luminescent *Enterobacter cloacae* at the population and single-cell levels. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2950-2957.
- Recorbet, G., A. Richaume & L. Jocteur-Monrozier, (1995) Distribution of a genetically-engineered *Escherichia coli* population introduced into soil. *Letters in Appl. Microbiology* **21**: 38-40.
- Recorbet, G., C. Steinberg & G. Faurie, (1992) Survival in soil of genetically engineered *Escherichia coli* as related to inoculum density, predation and competition. *FEMS Microbiol. Lett.* **101**: 251-260.
- Reddy, K. R., R. Khaleel & M. R. Overcash, (1981) Behavior and transport of microbial pathogens and indicator organisms in soils treated with organic wastes. *J. Environ. Qual.* **10**: 255-266.
- Regnault, B., S. Martin-Delautre, M. Lejay-Collin, M. Lefèvre & P. A. D. Grimont, (2000) Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization : specificity and potential applications. *Res. Microbiol.* **151**: 521-533.
- Rhodes, M. W. & H. Kator, (1988) Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2902-2907.
- Rice, E. W., M. J. Allen, D. J. Brenner & S. C. Edberg, (1991) Assay for  $\beta$ -Glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its applications for drinking-water analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 592-593.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. H. E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake & M. L. Cohen, (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**: 681-685.
- Robey, M., A. Benito, R. H. Huston, C. Pascual, S. F. Park & B. M. Mackey, (2001) Variation in resistance to high hydrostatic pressure and *rpoS* heterogeneity in natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4901-4907.



- Rockabrand, D., T. Austin, R. Kaiser & P. Blum, (1999) Bacterial growth state distinguished by single-cell protein profiling: does chlorination kill coliforms in municipal effluent? *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4181-4188.
- Rolland, K., N. Lambert-Zechovsky, B. Picard & E. Denamur, (1998) *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains of *E. coli*. *Microbiol.* **144**: 2667-2672.
- Roper, M. M. & K. C. Marshall, (1977) Effects of a clay mineral on microbial predation and parasitism of *Escherichia coli*. *Microbiol. Ecol.* **4**: 279-289.
- Roszak, D. B. & R. R. Colwell, (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **51**: 365-379.
- Saitou, N. & M. Nei, (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Savageau, M. A., (1983) *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *Am. Naturalist* **122**: 732-744.
- Schembri, M. A., K. Kjaergaard & P. Klemm, (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* **48**: 253-267.
- Schmidt, H., L. Beutin & H. Karch, (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* **63**: 1055-1061.
- Scott, L., P. McGee, J. J. Sheridan, B. Earley & N. Leonard, (2006) A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces. *J. Food Protection* **69**: 6-11.
- Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour & T. S. Whittam, (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 873-884.
- Selinger, D. W., K. J. Cheung, R. Mei, E. M. Johansson, C. S. Richmond, F. R. Blattner, D. J. Lockhart & G. M. Church, (2000) RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *Nat. Biotech.* **18**: 1262-1268.
- Shah, D., Z. Zhang, A. Khodursky, N. Kaldalu, K. Kurg & K. Lewis, (2006) Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* **6**.
- Shimada, T., H. Makinoshima, Y. Ogawa, T. Miki, M. Maeda & A. Ishihama, (2004) Classification and strength measurement of stationary-phase promoters by use of a newly developed promoter cloning vector. *J. Bacteriol.* **186**: 7112-7122.
- Sigler, V. & L. Pasutti, (2006) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to differentiate *Escherichia coli* populations in secondary environments. *Environmental Microbiology* **8**: 1703-1711.



- Signoretto, C., M. Lleò & P. Canepari, (2002) Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Cur. Microbiol.* **44**: 125-131.
- Simon, A. & E. H. Ridge, (1974) The use of ampicillin in a simplified selective medium for the isolation of fluorescent pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* **37**: 459-460.
- Sinton, L. W., R. R. Braithwaite, C. H. Hall & M. L. Mackenzie, (2007) Survival of indicator and pathogenic bacteria in bovine feces on pasture. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7917-7925.
- Six, J., H. Bossuyt, S. Degryze & K. Denef, (2004) A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Till. Res.* **79**: 7-31.
- Sjogren, R. E., (1994) Prolonged survival of an environmental *Escherichia coli* in laboratory soil microcosms. *Water Air Soil Pollut.* **75**: 389-403.
- Sledjeski, D. D., A. Gupta & S. Gottesman, (1996) The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**: 3993-4000.
- Small, P., D. Blankenhorn, D. Welty, E. Zinser & J. L. Slonczewski, (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* **176**: 1729-1737.
- Smith, R. J., A. T. Newton, C. R. Harwood & M. R. Barer, (2002) Active but nonculturable cells of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* do not infect or colonize mice. *Microbiol.* **148**: 2717-2726.
- Smith, M. S., G. W. Thomas, R. E. White & D. Ritonga, (1985) Transport of *Escherichia coli* through intact and disturbed soil columns. *J. Environ Qual* **14**: 87-91.
- Soil-survey-staff, (2006) *Keys to Soil Taxonomy*, p. 341. United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service.
- Solo-Gabriele, H. M., M. A. Wolfert, T. R. Desmarais & C. J. Palmer, (2000) Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 230-237.
- Somarelli, J. A., J. C. Makarewicz, R. Sia & R. Simon, (2007) Wildlife identified as major source of *Escherichia coli* in agriculturally dominated watersheds by BOX A1R-derived genetic fingerprints. *J. Environ. Manag.* **82**: 60-65.
- Soriano, J. M., H. Rico, J. C. Moltó & J. Mañes, (2001) Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiol.* **18**: 159-163.
- Souza, V., M. Rocha, A. Valera & L. E. Eguiarte, (1999) Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3373-3385.



- Stephens, C., (1998) Bacterial sporulation: A question of commitment? *Curr. Biol.* **8**: R45-R48.
- Stephenson, G. R. & R. C. Rychert, (1982) Bottom sediment: a reservoir of *Escherichia coli* in rangeland streams. *J. Range Manag.* **XI**.
- Surette, M. G. & B. L. Bassler, (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 7046-7050.
- Surette, M. G., M. B. Miller & B. L. Bassler, (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 1639-1644.
- Takiya, T., S. Futo, M. Tsuna, T. Namimatsu, T. Sakano, K. Kawai & T. Suzuki, (2004) Identification of single base-pair mutation on *uidA* gene of *Escherichia coli* O157:H7 by peptide nucleic acids (PNA) mediated PCR clamping. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **68**: 360-368.
- Tao, H., C. Bausch, C. Richmond, F. R. Blattner & T. Conway, (1999) Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J. Bacteriol.* **181**: 6425-6440.
- Tappeser, B., M. Jäger & C. Eckelkamp, (1998) *Survival, persistence, transfer - An update on current knowledge on GMOs and the fate of their recombinant DNA*. TWN Biotechnology and Biosafety Series.
- Tate, R. L., III, (1978) Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in histosols. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 925-929.
- Teather, R. M., J. F. Collins & W. D. Donachie, (1974) Quantal behavior of a diffusible factor which initiates septum formation at potential division sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **118**: 407-413.
- Texier, S., C. Prigent-Combaret, M. H. Gourdon, M. A. Poirier, P. Faivre, J. M. Dorioz, J. Poulénard, L. Jocteur-Monrozier, Y. Moëgne-Loccoz & D. Trevisan, (2008) Persistence of culturable *Escherichia coli* fecal contaminants in dairy alpine grassland soils *J. Environ. Qual.* **37**: 2299-2310.
- Thelin, R. & G. Gifford, (1983) Fecal coliform release patterns from fecal material of cattle. *J. Environ. Qual.* **12**: 57-63.
- Tiunov, A. V. & S. Scheu, (2000) Microbial biomass, biovolume and respiration in *Lumbricus terrestris* L. cast material of different age. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 265-275.
- Torres, A. G., C. Jeter, W. Langley & A. G. Matthyse, (2005) Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to Alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8008-8015.



- Travers, A. & G. Muskhelishvili, (2005) DNA supercoiling- a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 157-169.
- Trevisan, D., J. Y. Vansteelant & J. M. Dorioz, (2002) Survival and leaching of fecal bacteria after slurry spreading on mountain hay meadows: consequences for the management of water contamination risk. *Water Res.* **36**: 275-283.
- Troxler, J., M. Zala, A. Natsch, Y. Moenne-Loccoz & G. Defago, (1997) Autecology of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the rhizosphere and inside roots at later stages of plant development. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 119-130.
- Tryland, I. & L. Fiksdal, (1998) Enzyme characteristics of  $\beta$ -D-galactosidase- and  $\beta$ -D-glucuronidase-positive bacteria and their Interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1018-1023.
- Tyrrel, S. F. & J. N. Quinton, (2003) Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. *Journal of Appl. Microbiology* **94**: 87-93.
- Van Donsel, D. J., E. E. Geldreich & N. A. Clarke, (1967) Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to storm-water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **15**: 1362-1370.
- VanVeen, J. A. & P. J. Kuikman, (1990) Soil structural aspects of decomposition of organic matter by micro-organisms *Biogeochem.* **11**: 213.
- Vargas, R. & T. Hattori, (1986) Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. *FEMS Microbiol. Lett.* **38**: 233-242.
- Venturi, V., (2003) Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol. Microbiol.* **49**: 1-9.
- Villarino, A., O. M. M. Bouvet, B. Regnault, S. Martin-Delautre & P. A. D. Grimont, (2000) Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in liveand heat- or UV-killed cells. *Res. Microb.* **151**: 755-768.
- Vinten, A. J. A., J. T. Douglas, D. R. Lewis, M. N. Aitken & D. R. Fenlon, (2004) Relative risk of surface water pollution by *E. coli* derived from faeces of grazing animals compared to slurry application. *Soil Use Manag.* **20**: 13-22.
- Wada, A., (1998) Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes Cells* **3**: 203-208.
- Wang, G., T. Zhao & M. P. Doyle, (1996) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2567-2570.
- Watnick, P. & R. Kolter, (2000) Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**: 2675-2679.
- Wei, W., Z. Cao, Y.-L. Zhu, X. Wang, G. Ding, H. Xu, P. Jia, D. Qu, A. Danchin & Y. Li, (2006) Conserved genes in a path from commensalism to pathogenicity: comparative



- phylogenetic profiles of *Staphylococcus epidermidis* RP62A and ATCC12228. *BMC Genomics* **7**: 112.
- Wei, Y., J.-M. Lee, C. Richmond, F. R. Blattner, J. A. Rafalski & R. A. LaRossa, (2001) High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 545-556.
- Weiser, R. S. & C. M. Osterud, (1945) Studies on the death of bacteria at low temperatures: I. The influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period of exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **50**: 413-439.
- Wertz, J. E., C. Goldstone, D. M. Gordon & M. A. Riley, (2003) A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. *J. Evol. Biol.* **16**: 1236-1248.
- Whiteley, M., M. G. Banger, R. E. Bumgarner, M. R. Parsek, G. M. Teitzel, S. Lory & E. P. Greenberg, (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-864.
- Williams, A. P., L. M. Avery, K. Killham & D. L. Jones, (2007) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the rhizosphere of maize grown in waste-amended soil. *Journal of Appl. Microbiology* **102**: 319-326.
- Williams, A. P., P. Roberts, L. M. Avery, K. Killham & D. L. Jones, (2006) Earthworms as vectors of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and vermicomposts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 54-64.
- Winfield, M. D. & E. A. Groisman, (2003) Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3687-3694.
- Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. J. Maiden, H. Ochman & M. Achtman, (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* **60**: 1136-1151.
- Withers, H. L. & K. Nordstrom, (1998) Quorum-sensing acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 15694-15699.
- Wolf, S. G., D. Frenkiel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter & A. Minsky, (1999) DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature* **400**: 83-85.
- Wösten, M. M. S. M., (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 127-150.
- Yamagishi, M., H. Matsushima, A. Wada, M. Sakagami, N. Fujita & A. Ishihama, (1993) Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. *EMBO J.* **12**: 625-630.
- Yang, H.-H., R. T. Vinopal, D. Grasso & B. F. Smets, (2004) High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1528-1536.



- Yeates, C., M. R. Gillings, A. D. Davison, N. Altavilla & D. A. Veal, (1998) Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol. Procedures Online* **1**: 40-47.
- Young, I. M. & K. Ritz, (2000) Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil Till. Res.* **53**: 201-213.
- Zgurskaya, H. I., M. Keyhan & A. Matin, (1997) The sigma S level in starving *Escherichia coli* cells increases solely as a result of its increased stability, despite decreased synthesis. *Mol. Microbiol.* **24**: 643-651.
- Zhai, Q., M. S. Coyne & R. I. Barnhisel, (1995) Mortality rates of fecal bacteria in subsoil amended with poultry manure. *Bioresour. Technol.* **54**: 165-169.
- Zhang, X. & H. Bremer, (1996) Effects of Fis on ribosome synthesis and activity and on rRNA promoter activities in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **259**: 27-40.



## **Annexes**



# Annexes

Annexe I : Le site d'étude : l'Alpage de Bise .....	1
Annexe II : Croissance bactérienne.....	10
Annexe III : Etat physiologique .....	12



**ANNEXE I :**  
**Le site d'étude : l'Alpage de Bise**



**Relevés végétation effectués au cours de la saison 2005. Le chiffre à côté des noms latins indiquent l'abondance relative de chaque espèce végétale**

**Station Poa**

<i>Festuca rubra</i> 3 (herbaceae)	<i>Potentilla tormentilla</i> 1
<i>Cynosurus cristatus</i> 2	<i>Lolium perenne</i> 1
<i>Plantago major</i> 2	<i>Ranunculus repens</i> 1
<i>Poa alpina</i> 2	<i>Rhinanthus crista galli</i> 1
<i>Plantago montana</i> 2	<i>Rumex alpinus</i> 1
<i>Trifolium campestre</i> 2	<i>Asplenium ruta-muraria</i> 1
<i>Trifolium pratense</i> 2	<i>Scabiosa triandra</i> 1
<i>Trifolium repens</i> 2	<i>Senecio alpinus</i> 1
<i>Achillea millefolium</i> 1	<i>Thymus serpyllum</i> 1
<i>Agrostis tenuis</i> 1	<i>Trisetum flavescens</i> 1
<i>Alchemilla nitida</i> 1	<i>Valeriana dioica</i> 1
<i>Alchemilla xanthochlora</i> 1	<i>Aconitum pyramidale</i> +
<i>Prunella vulgaris</i> 1	<i>Aconitum vulparia</i> +
<i>Campanula Scheuchzeri</i> 1	<i>Hypericum tetrapterum</i> +
<i>Deschampsia caespitosa</i> 1	
<i>Carduus defloratus</i> 1	
<i>Cirsium spinosissimum</i> 1	
<i>Cirsium acaule</i> 1	
<i>Crepis pyrenaica</i> 1	
<i>Carum carvi</i> 1	
<i>Dactylis glomerata</i> 1	
<i>Euphorbia cyparissias</i> 1	
<i>Euphrasia minima</i> 1	
<i>Festuca pratensis</i> 1	
<i>Phleum alpinum</i> 1	
<i>Galium lucidum</i> 1	
<i>Gentiana lutea</i> 1	
<i>Gentiana verna</i> 1	
<i>Geranium sylvaticum</i> 1	
<i>Pimpinella major</i> 1	
<i>Leontodon hispidus</i> 1	
<i>Lotus corniculatus</i> 1	
<i>Hypericum maculatum</i> 1	
<i>Sedum album</i> 1	
<i>Urtica dioica</i> 1	
<i>Bellis perennis</i> 1	
<i>Petasites albus</i> 1	
<i>Plantago alpina</i> 1	
<i>Plantago media</i> 1	



### Station Caltha

<i>Chaerophyllum hirsutum</i> 2	<i>Dactylis glomerata</i> 1
<i>Mentha sylvestris</i> 2	<i>Epilobium montanum</i> 1
<i>Caltha palustris</i> 2	<i>Euphrasia minima</i> 1
<i>Rumex alpinus</i> 2	<i>Festuca pratensis</i> 1
<i>Senecio alpinus</i> 2	<i>Phleum alpinum</i> 1
<i>Carex muricata</i> 1	<i>Gentiana lutea</i> 1
<i>Carex sp.</i> 1	<i>Geranium sylvaticum</i> 1
<i>Achillea millefolium</i> 1	<i>Astrantia major</i> 1
<i>Aconitum pyramidale</i> 1	<i>Lotus corniculatus</i> 1
<i>Agrostis tenuis</i> 1	<i>Luzula sudetica</i> 1
<i>Alchemilla nitida</i> 1	<i>Leucanthemum vulgare</i> 1
<i>Alchemilla xanthochlora</i> 1	<i>Hypericum maculatum</i> 1
<i>Helictotrichon pratense</i> 1	<i>Dactylorhiza maculata</i> 1
<i>Prunella vulgaris</i> 1	<i>Urtica dioica</i> 1
<i>Campanula Scheuchzeri</i> 1	<i>Bellis perennis</i> 1
<i>Deschampsia caespitosa</i> 1	<i>Petasites albus</i> 1
<i>Carduus defloratus</i> 1	<i>Plantago media</i> 1
<i>Crepis pyrenaica</i> 1	<i>Ranunculus acris</i> 1
<i>Cynosurus cristatus</i> 1	<i>Rhinanthus crista galli</i> 1
<i>Thymus serpyllum</i> 1	<i>Trifolium repens</i> 1
<i>Trifolium campestre</i> 1	<i>Trisetum flavescens</i> 1
<i>Trifolium pratense</i> 1	<i>Veratrum album</i> 1 (muscinale)
<i>Carum carvi</i> 1	<i>Clinopodium vulgare</i> 1



### Station Nardus

<i>Arnica montana</i> 2	<i>Gentiana purpurea</i> 2
<i>Deschampsia flexuosa</i> 2	<i>Campanula barbata</i> 2
<i>Nardus strictus</i> 1	<i>Agrostis tenuis</i> 1
<i>Vaccinium uliginosum</i> 1	<i>Vaccinium Vitis-idæa</i> 1
<i>Calluna vulgaris</i> 1	<i>Deschampsia caespitosa</i> 1
<i>Carex glauca</i> 1	<i>Centaurea montana</i> 1
<i>Carduus defloratus</i> 1	<i>Festuca rubra</i> 1
<i>Anthoxanthum odoratum</i> 1	<i>Gnaphalium norvegicum</i> 1
<i>Lotus corniculatus</i> 1	<i>Luzula campestris</i> 1
<i>Vaccinium myrtillus</i> 1	<i>Potentilla tormentilla</i> 1
<i>Rhinanthus crista galli</i> 1	<i>Solidago virgaurea</i> 1
<i>Trifolium pratense</i> 1	<i>Trollius europaeus</i> 1
<i>Veratrum album</i> 1	

### Station Rumex

<i>Rumex alpinus</i> 3	<i>Agrostis tenuis</i> 2
<i>Phleum alpinum</i> 2	<i>Trifolium pratense</i> 2
<i>Alchemilla xanthochlora</i> 1	<i>Carex sp.</i> 1
<i>Leontodon hispidus</i> 1	<i>Urtica dioica</i> 1
<i>Poa supina</i> 1	<i>Plantago media</i> 1
<i>Ranunculus repens</i> 1	





Couvert végétal de la *Poa* (en haut) et du *Rumex* (en bas)



Système racinaire sous *Poa*



Système racinaire sous *Rumex*





*Rumex oxydé*. L'horizon profond oxydé est visible (couche orangée)



*Rumex réduit*



## Fiches de comptage des bouses

Station	date	fraîche			sèche		
	<b>13/06/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
Cone							
Gazon		21			6		1
Trisète							
Nardaie							
Marais							
Traversée		29	4	1			
Rumex		17	10	4	1		
Terrasette							
<b>TOTAL</b>		<b>67</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Station	date	fraîche			sèche		
	<b>20/06/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
Cone					40	2	
Gazon					22	1	4
Trisète							
Nardaie							
Marais		1			12	3	
Traversée					25	2	3
Rumex		1		3	46	17	4
Terrasette							
<b>TOTAL</b>		<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>145</b>	<b>25</b>	<b>11</b>
Station	date	fraîche			sèche		
	<b>27/06/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
Cone		4	1		20	3	
Gazon					20	7	1
Trisète							
Nardaie							
Marais					13	1	
Traversée	5				30	1	2
Rumex					38	3	4
Terrasette							
<b>TOTAL</b>		<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>121</b>	<b>15</b>	<b>7</b>
Station	date	fraîche			sèche		
	<b>04/07/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
Cone		1	4	1	12	1	
Gazon		5	2		18	11	1
Trisète							
Nardaie		6	3		3		
Marais		6			5	1	
Traversée		3			22	5	3
Rumex		15	8	1	40	18	3



<b>Terrasette</b>		<b>1</b>	<b>1</b>				
<b>TOTAL</b>		<b>37</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>36</b>	<b>7</b>
<b>Station</b>	<b>date</b>	<b>fraîche</b>			<b>sèche</b>		
	<b>11/07/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
<b>Cone</b>		<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>3</b>
<b>Gazon</b>					<b>24</b>	<b>7</b>	
<b>Trisète</b>							
<b>Nardaie</b>					<b>6</b>	<b>1</b>	
<b>Marais</b>		<b>2</b>	<b>1</b>		<b>5</b>	<b>1</b>	
<b>Traversée</b>		<b>8</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>27</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
<b>Rumex</b>		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>40</b>	<b>15</b>	<b>8</b>
<b>Terrasette</b>		<b>3</b>		<b>1</b>			
<b>TOTAL</b>		<b>18</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>113</b>	<b>35</b>	<b>13</b>
<b>Station</b>	<b>date</b>	<b>fraîche</b>			<b>sèche</b>		
	<b>18/07/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
<b>Cone</b>		<b>10</b>		<b>1</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>4</b>
<b>Gazon</b>		<b>3</b>			<b>35</b>	<b>7</b>	
<b>Trisète</b>							
<b>Nardaie</b>					<b>8</b>		
<b>Marais</b>		<b>5</b>			<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Traversée</b>					<b>9</b>	<b>11</b>	<b>4</b>
<b>Rumex</b>					<b>45</b>	<b>17</b>	<b>5</b>
<b>Terrasette</b>					<b>2</b>		
<b>TOTAL</b>		<b>18</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>120</b>	<b>48</b>	<b>16</b>
<b>Station</b>	<b>date</b>	<b>fraîche</b>			<b>sèche</b>		
	<b>25/07/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
<b>Cone</b>		<b>10</b>			<b>19</b>	<b>10</b>	<b>2</b>
<b>Gazon</b>		<b>8</b>			<b>29</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
<b>Trisète</b>							
<b>Nardaie</b>					<b>13</b>	<b>2</b>	
<b>Marais</b>		<b>7</b>	<b>1</b>		<b>12</b>	<b>5</b>	
<b>Traversée</b>		<b>18</b>			<b>34</b>	<b>5</b>	
<b>Rumex</b>		<b>17</b>	<b>1</b>		<b>42</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
<b>Terrasette</b>					<b>6</b>	<b>2</b>	
<b>TOTAL</b>		<b>60</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>155</b>	<b>36</b>	<b>11</b>
<b>Station</b>	<b>date</b>	<b>fraîche</b>			<b>sèche</b>		
	<b>01/08/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
<b>Cone</b>		<b>8</b>	<b>2</b>		<b>23</b>	<b>7</b>	<b>3</b>
<b>Gazon</b>		<b>41</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>1</b>
<b>Trisète</b>		<b>3</b>	<b>1</b>				
<b>Nardaie</b>		<b>3</b>	<b>1</b>		<b>20</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Marais</b>			<b>2</b>		<b>20</b>	<b>2</b>	
<b>Traversée</b>		<b>12</b>	<b>3</b>		<b>65</b>	<b>1</b>	

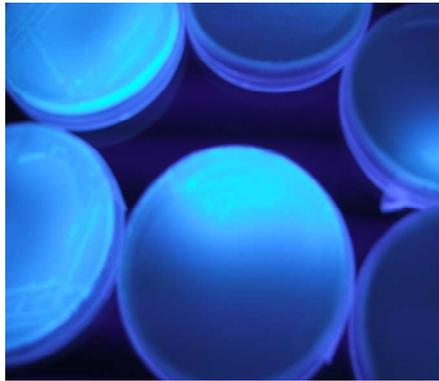


<b>Rumex</b>		<b>8</b>			<b>40</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>Terrasette</b>		<b>2</b>			<b>8</b>	<b>3</b>	
<b>TOTAL</b>		<b>77</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>196</b>	<b>29</b>	<b>13</b>
<b>Station</b>	<b>date</b>	<b>fraîche</b>			<b>sèche</b>		
	<b>08/08/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
<b>Cone</b>			<b>1</b>	<b>2</b>	<b>47</b>	<b>13</b>	<b>6</b>
<b>Gazon</b>					<b>80</b>	<b>14</b>	<b>8</b>
<b>Trisète</b>				<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	
<b>Nardaie</b>					<b>26</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>Marais</b>					<b>32</b>	<b>11</b>	<b>3</b>
<b>Traversée</b>		<b>15</b>			<b>29</b>	<b>28</b>	<b>3</b>
<b>Rumex</b>			<b>2</b>		<b>56</b>	<b>16</b>	<b>8</b>
<b>Terrasette</b>		<b>1</b>			<b>3</b>	<b>3</b>	
<b>TOTAL</b>		<b>16</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>276</b>	<b>90</b>	<b>30</b>
<b>Station</b>	<b>date</b>	<b>fraîche</b>			<b>sèche</b>		
	<b>16/08/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
<b>Cone</b>					<b>26</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Gazon</b>					<b>40</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
<b>Trisète</b>					<b>5</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Nardaie</b>				<b>1</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Marais</b>		<b>4</b>			<b>13</b>	<b>8</b>	<b>3</b>
<b>Traversée</b>		<b>16</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>22</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
<b>Rumex</b>					<b>30</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
<b>Terrasette</b>		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>		
<b>TOTAL</b>		<b>22</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>157</b>	<b>37</b>	<b>23</b>
<b>Station</b>	<b>date</b>	<b>fraîche</b>			<b>sèche</b>		
	<b>22/08/06</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>	<b>petite</b>	<b>moyenne</b>	<b>grosse</b>
<b>Cone</b>					<b>9</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Gazon</b>				<b>2</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>1</b>
<b>Trisète</b>					<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>Nardaie</b>		<b>2</b>		<b>2</b>	<b>17</b>		<b>2</b>
<b>Marais</b>					<b>14</b>	<b>6</b>	<b>2</b>
<b>Traversée</b>		<b>8</b>			<b>21</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>Rumex</b>					<b>35</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Terrasette</b>							
<b>TOTAL</b>		<b>10</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>106</b>	<b>22</b>	<b>14</b>



**ANNEXE II :**  
**Croissance bactérienne**





Colonies d'*E. coli* visualisées sous UV après croissance sur milieu MU/Ec solide à 44°C



Croissance de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur milieu King's B<sup>+++</sup> après une incubation de 3 j à 28°C. La fluorescence jaune indique la croissance.



**Annexes III :**  
**Etat physiologique**

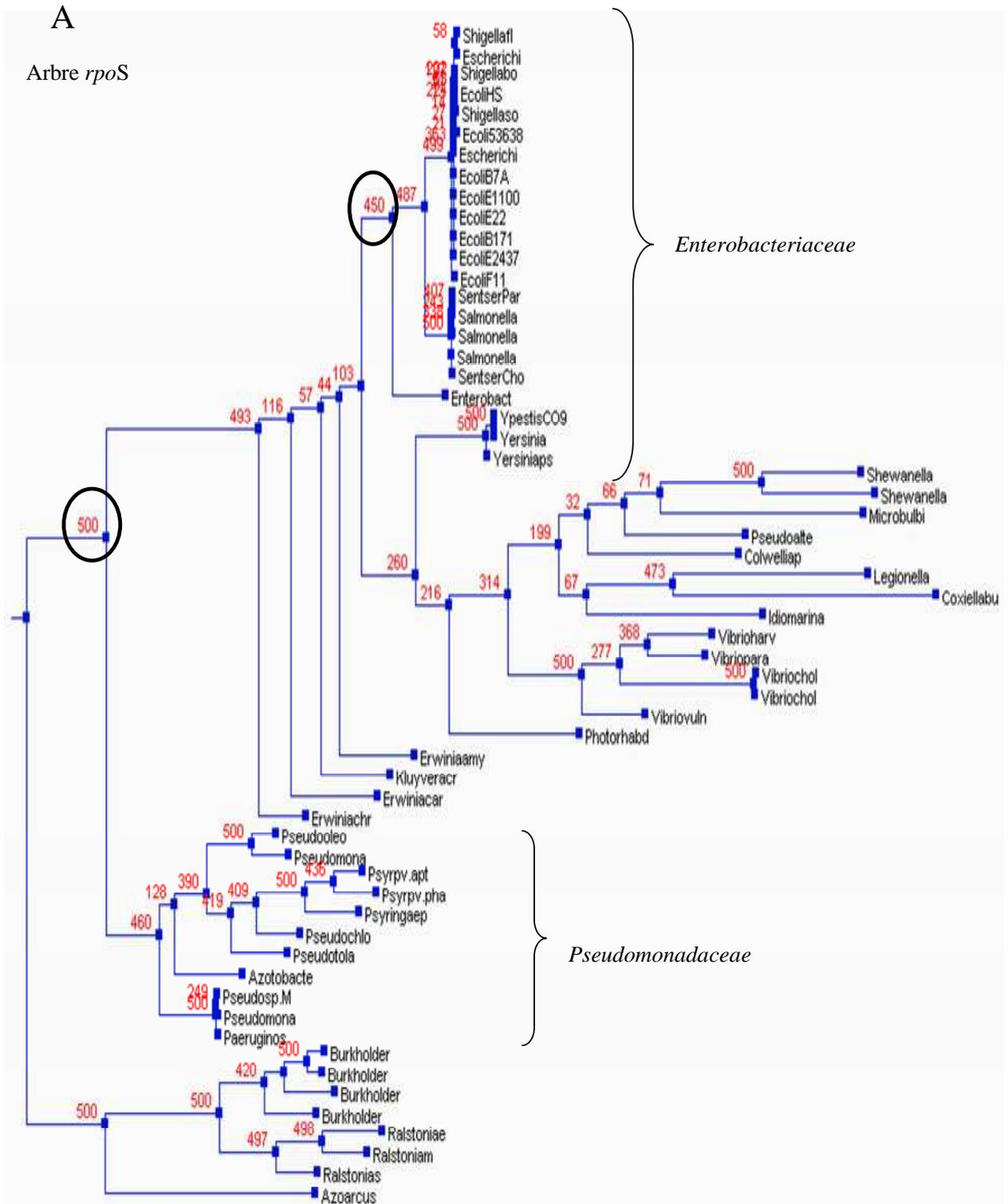


Nom	N° accession
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> SCRI1043	BX950851
<i>Escherichia coli</i> CFT073	AE014075
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	AE005174
<i>Escherichia coli</i> K12	U00096
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> SC-B67	AE017220
<i>S. enterica</i> serovar <i>paratyphiA</i> ATCC9150	CP000026
<i>S. enterica</i> serovar <i>typhi</i> Ty2	AE014613
<i>S. enterica</i> CT18	AL513382
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	AE006468
<i>Shigella flexneri</i> 2a 301	AE005674
<i>S. flexneri</i> 2a 2457T	AE014073
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	CP000038
<i>Yersinia pestis</i> biovar <i>medievalis</i> 91001	AE017042
<i>Y. pestis</i> CO92	AL590842
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	BX936398
<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	BX470251
<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	BA000037
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar <i>eltor</i> N16961	AE003852
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	BA000031
<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	AE016795
<i>Vibrio fischeri</i> ES114	CP000020
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> Pm70	AE004439
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	AE014299
<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR	AE017340
<i>Colwellia psychrerythraea</i> 34H	CP000083
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125	CR954246
<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP	CP000057
<i>Legionella pneumophila</i> Lens	CR628337
<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493	AE016828
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	AE017282
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	CP000076
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	CP000075
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1	CP000094
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	AE015451
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	AE016853
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	AE004091
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	CP000058
<i>Psychrobacter arcticus</i> 273-4	CP000082
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	AE013598
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 85-10	AM039952
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	AE003849
<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	CR555306
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	AL646052
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	CP000091
<i>Burkholderia pseudomallei</i> k96243	BX571965
<i>Burkholderia</i> sp. 383	CP000150
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	AE016825
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	AL157959
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	AL954747.1
<i>Wolbachia</i>	AE017196
<i>Ehrlichia ruminantium</i> Gardel	CR925677
<i>Ehrlichia ruminantium</i> Welgevonden	CR925678
<i>Ehrlichia ruminantium</i> Welgevonden	CR767821
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	BA000040
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	AE008688
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	AL591688
<i>Brucella suis</i> 1330	AE014291
<i>Brucella melitensis</i> biovar <i>abortus</i> 2308	AM040264
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	BA000012
<i>Bartonella quintana</i> Toulouse	BX897700
<i>Brucella melitensis</i> 16M	AE008917
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255	CP000115
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	AP007255
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	AE005673
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	AE000511
<i>Helicobacter pylori</i> J99	AE001439
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC11168	AL111168
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	AE016830
<i>Streptococcus thermophilus</i> CNRZ1066	CP000024



Nom	n° d'accension pour chaque gène					
	<i>ftsZ</i>	<i>rpoZ</i>	<i>fis</i>	<i>rpoS</i>	<i>dps</i>	<i>rmf</i>
<i>Citrobacter freundii</i>			AAO47736.1		AAO47739.1	
<i>Enterobacter cloacae</i>				CAA73683.1	AAO41729.1	
<i>Erwinia amylovora</i>				CAA10959.1		
<i>Erwinia chrysanthemi</i>				CAC44359		
<i>E. coli</i> 53638			ZP_00733914.1	ZP_00734901.1		
<i>E. coli</i> B171		ZP_00708976.1	ZP_00708803	ZP_00711071.1	ZP_00710741	
<i>E. coli</i> E110019		ZP_00719110.1	ZP_00713405	ZP_00719834.1	ZP_00720254.1	
<i>E. coli</i> F11		ZP_00726316.1	ZP_00721889	ZP_00725687.1	ZP_00722151.1	
<i>E. coli</i> E22		ZP_00729638.1	ZP_00727238	ZP_00728523.1	ZP_00729087.1	
<i>E. coli</i> B7A		ZP_00715624.1	ZP_00714316	ZP_00716558.1	ZP_00717127.1	
<i>E. coli</i> HS	ZP_00704382.1	ZP_00707622.1	ZP_00707273	ZP_00706786.1	ZP_00705033.1	
<i>E. coli</i> E24377A	ZP_00702462.1	ZP_00701674.1	ZP_00701326	ZP_00700736.1	ZP_00703120.1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			AAC77889.1		AAO41730.1	
<i>Kluyvera cryocrescens</i>			AAN85639.1	CAA05499.1		
<i>Proteus vulgaris</i>			AAO47737.1		AAO47740.1	
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>			AAO47738.1		AAO47741.1	
<i>Shigella boydii</i> BS512		ZP_00699679.1				
<i>Shigella boydii</i> CDPH						
<i>Vibrio harveyi</i>						
<i>Vibrio cholerae</i> V51				AF321124_1		
<i>Shewanella amazonensis</i> SB2B		ZP_00586601.1				ZP_00587217.1
<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	EAN70511.1	EAN71732.1		EAN71274.1		
<i>Microbulbifer degradans</i> 2-40	ZP_00315078.1	ZP_00316365.1	ZP_00315124.1	ZP_00315173.1		
<i>Haemophilus somnus</i> 2336		ZP_00131867.1				
<i>Pseudomonas oleovorans</i>				CAD57977.1		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>				AAP97086.1		
<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>				AAN59884.1		
<i>Pseudomonas tolaasii</i>				BAA21674.1		
<i>Pseudomonas</i> sp. M18				AAU85546.1		
<i>Pseudomonas putida</i> F1					ZP_00902326.1	ZP_00900795.1
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14		ZP_00141818.1	ZP_00141309.1	ZP_00137012.2		
<i>Pseudomonas stutzeri</i>						
<i>Azotobacter vinelandii</i>		EAM08521.1		AY029155.1	ZP_00419886.1	EAM04274.1
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	ZP_00599074.1	EAN52973.1	EAN54762.1		ZP_00598799.1	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> S13		ZP_00498334.1	ZP_00497821.1		ZP_00496758.1	
<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1		ZP_00451553.1			ZP_01010996.1	
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400	ZP_00277702.1		ZP_00281399.1		ZP_00282772.1	
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	ZP_00459356.1				EAM17720.1	
<i>Burkholderia cenocepacia</i> PC184						
<i>Burkholderia cepacia</i> SEMIA 6394						
<i>Nitrosomonas eutropha</i> C71	ZP_00670465.1					
<i>Wolbachia</i> sp. TRS of <i>Brugia malayi</i>						
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H					YP_191140.1	
<i>Gluconobacter albidus</i> NBRC 3273						
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 6420						
<i>Rhizobium elti</i>		DQ010057				
<i>Rhizobium phaseoli</i>						
<i>Mesorhizobium</i> sp. CCNWGX022						
<i>Bartonella bacilliformis</i> KC584						



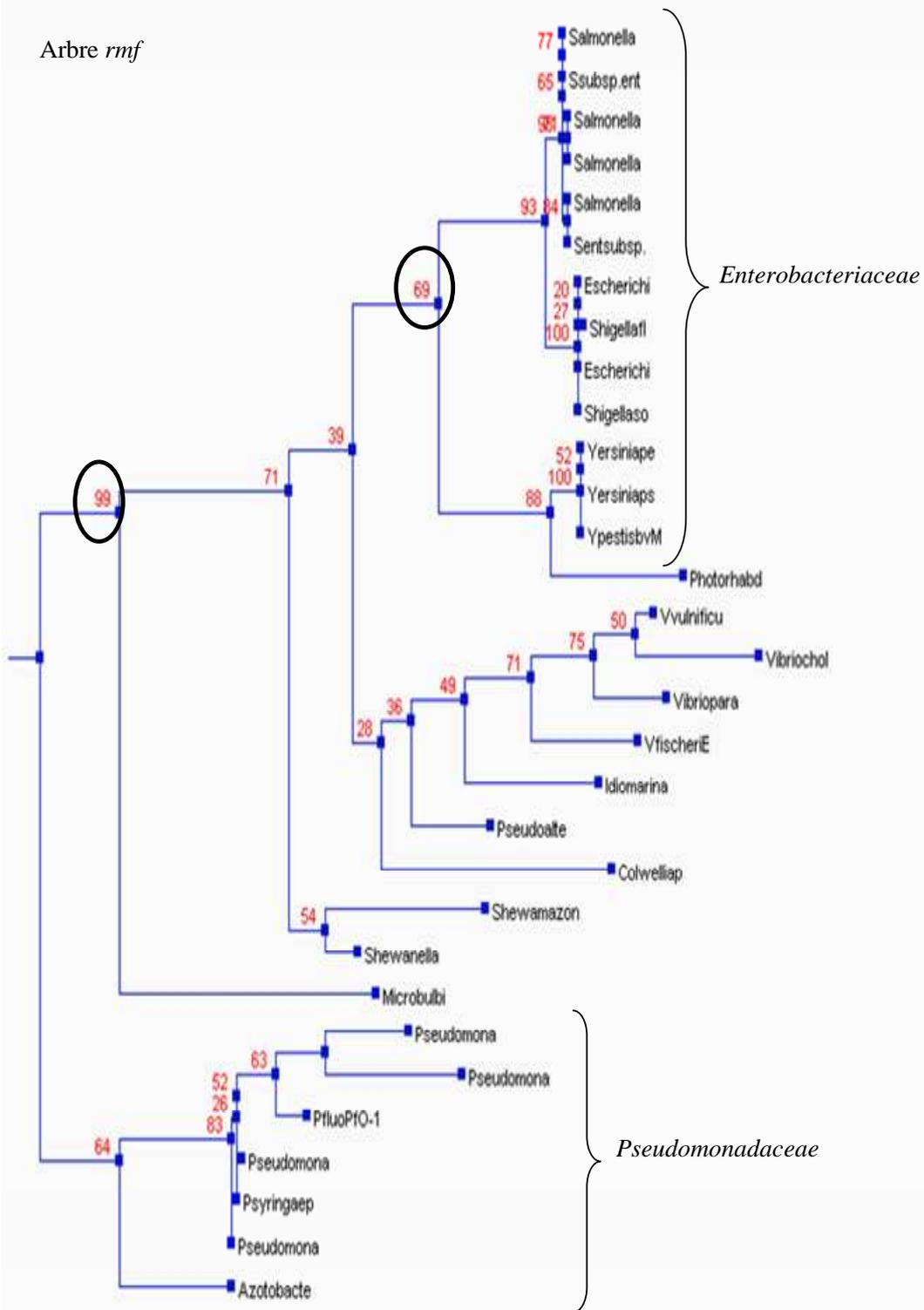


Arbres phylogénétiques obtenus par la méthode du maximum de vraisemblance (ML) sur les différents marqueurs de l'état physiologique : A pour le gène *rpoS*; B pour le gène *rmf*; C pour le gène *dps*; D pour le gène *fis*; E pour le gène *rpoZ*; F pour le gène *ftsZ*



# B

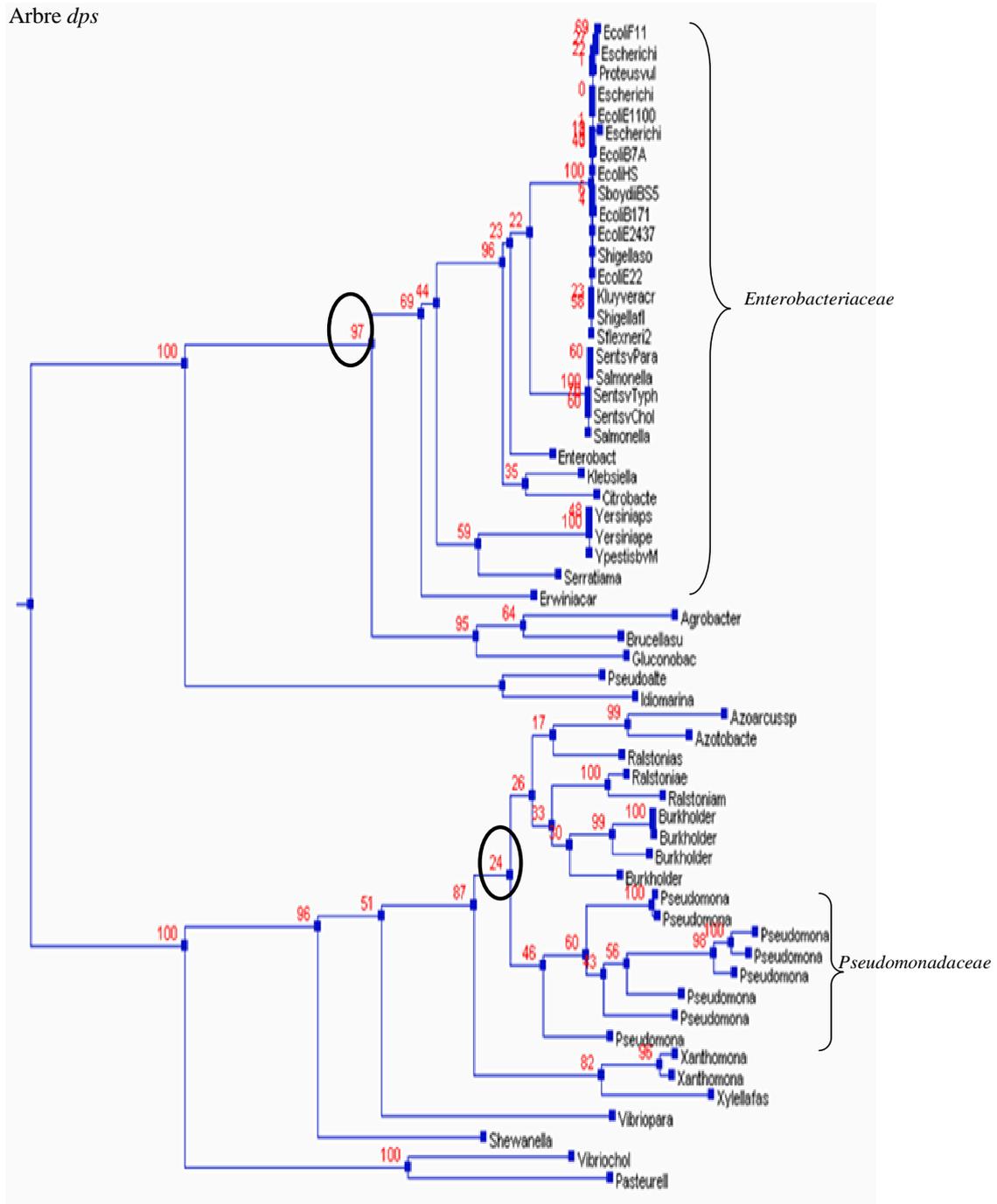
Arbre *rmf*





C

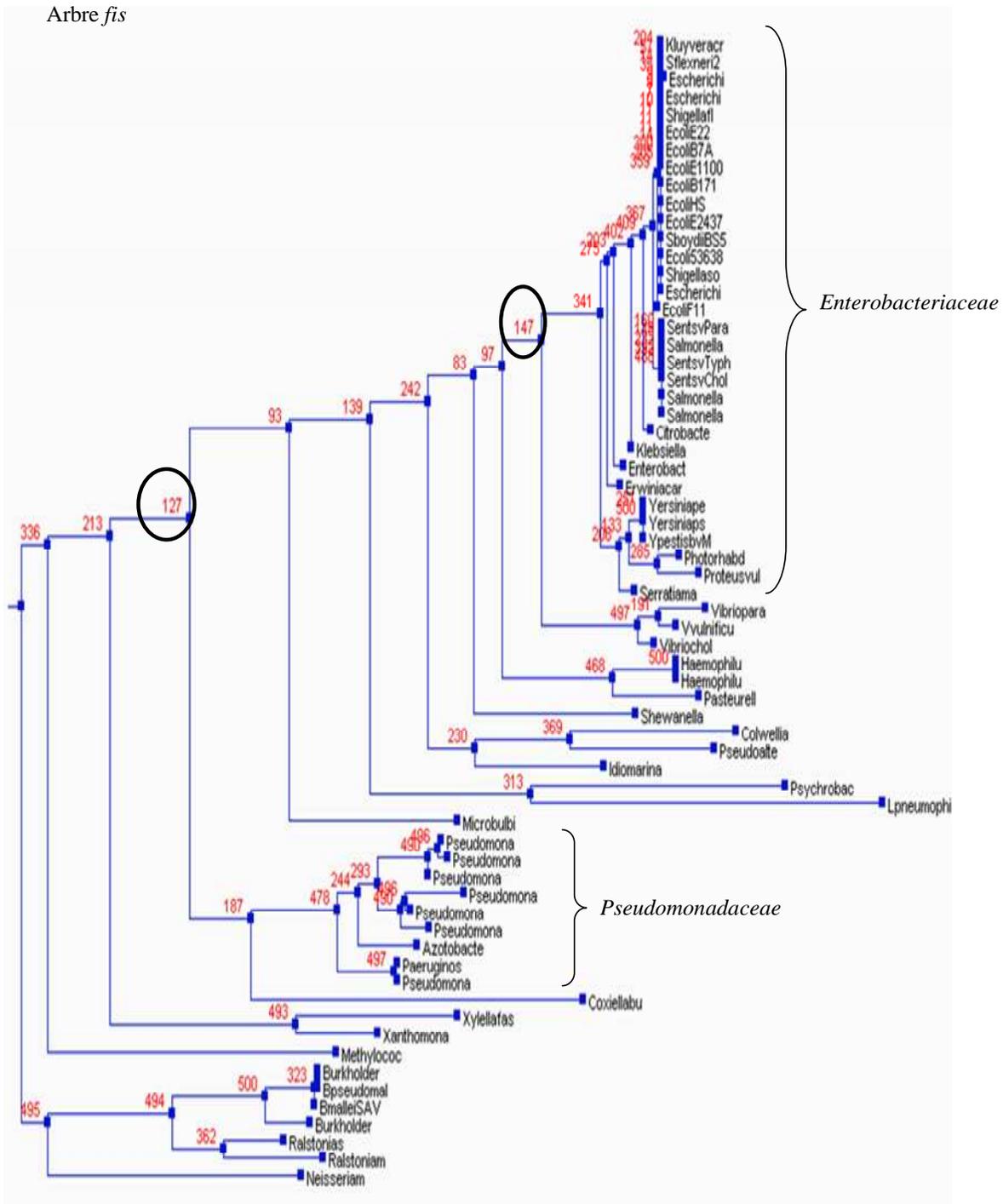
Arbre *dps*





# D

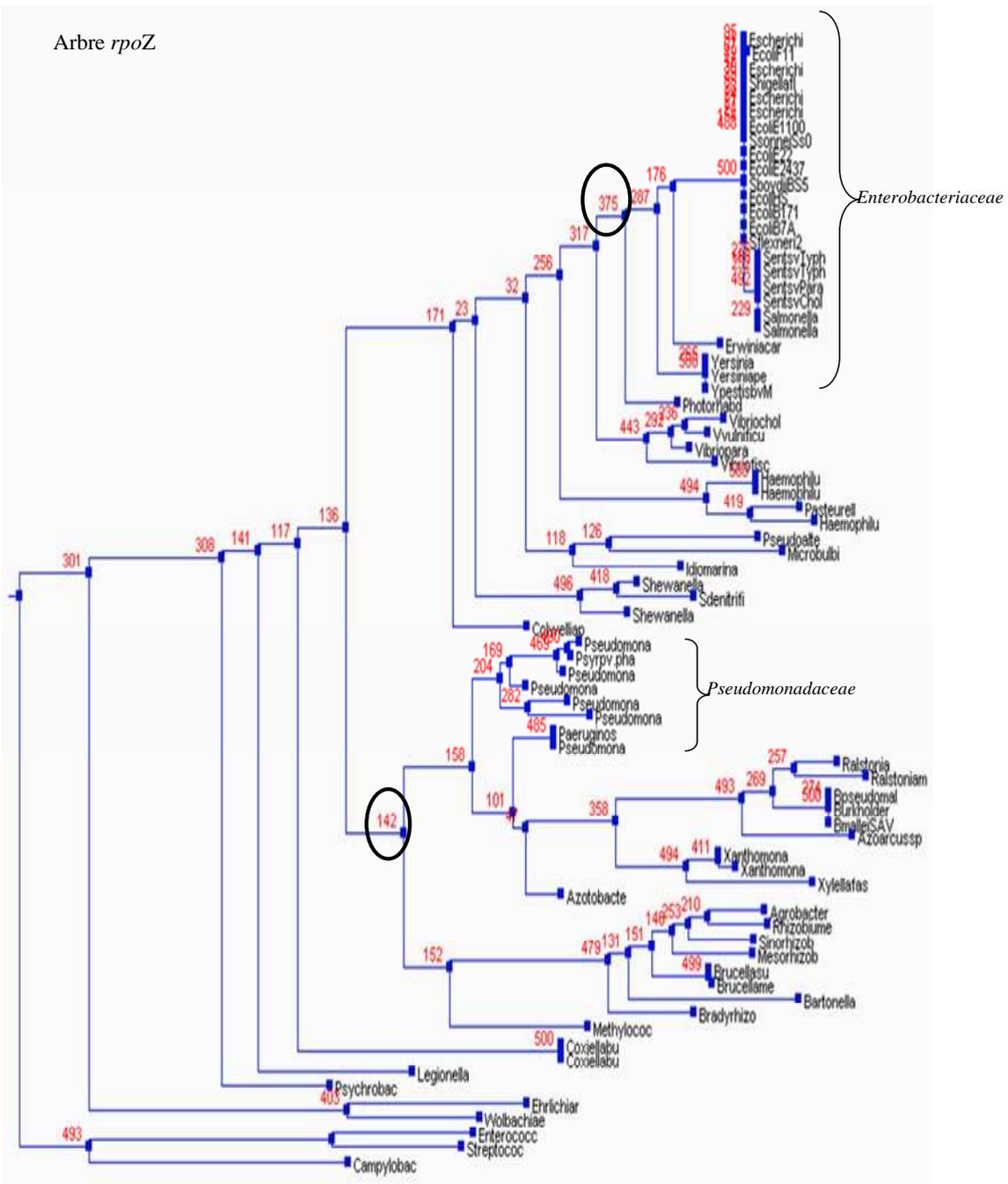
Arbre *fis*





E

Arbre *rpoZ*









# EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES TOTAUX

*Protocoles GRIFFITHS et al., 2000 et BÜRGMANN et al., 2003 et Triplett et al., 1998  
modifiés.*

*D'après Thèse de H. El ZEMRANY*

## MODE OPERATOIRE

### A. Préparation des échantillons de sol

→Ajouter 0,500 g de sol à un micro tube de 2 mL contenant environ **500 µL** de billes de Zirconium-silice.

### B. Lyse chimique et mécaniques des cellules ou des particules virales :

→Ajouter à chacun des échantillons sortis du congélateur :

**\*500 µL de solution d'extraction**

→Puis rajouter :

**\*500 µL** du mélange **PCAI** (phénol chloroforme alcool isoamylique 25/24/1- v/v/v) si l'objectif est une **co-extraction ADN/ARN**.

→Vortexer légèrement afin d'homogénéiser le mélange sol/billes/solutions d'extraction.

→Agiter les échantillons avec le **vibro-broyeur** RESCHT MM 2000 pendant **2X45 secondes** à la **vitesse maximale** (amplitude 100). (On préconise une vitesse de rotation de 6,5 m/s). Les plots du vibro-broyeur doivent avoir été refroidis pendant au moins 12 heures à -20°C et être RNase-free, ce qui suppose un nettoyage au SDS et un rinçage à l'eau UP traitée au DEPC préalable.

Entre les deux agitations, faire incubé les échantillons 1 minute dans la glace.

→A la fin de la deuxième agitation, transférer les échantillons dans la glace.

### C. Extraction des résidus protéiques par le mélange PCAI (co-extraction)

→Centrifuger à **16000 g** pendant **10 minutes** à +4°C les tubes après l'étape au vibro-broyeur.

→Récupérer la **phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques**. Couper en biseau le bout du cône de la pipette. Les résidus organiques restent dans la phase inférieure. Attention à ne pas prélever l'interface. Sinon renouveler l'extraction à partir de cette phase aqueuse supérieure jusqu'à ce que l'interface soit propre.

→ Transférer la phase aqueuse dans un tube Eppendorf de **2 mL**

→Renouveler toute l'opération en rajoutant de nouveau au culot de sol

**\*500 µL de solution d'extraction**

PUIS



**\*500  $\mu\text{L}$**  du mélange **PCAI** (phénol chloroforme alcool isoamylique 25/24/1- v/v/v)



→Homogénéiser le mélange, agiter au vibro-broyeur et centrifuger selon les mêmes modalités que précédemment.

## D. Complément de l'extraction par le mélange chloroforme/isoamylalcool

→Regrouper les phases aqueuses obtenues pour un échantillon dans un **même tube Eppendorf de 2 mL**. Distribuer éventuellement le mélange dans **deux tubes** si le volume recueilli est **supérieur à 1 mL**.

→Chaque tube reçoit un **volume égal** du mélange **CAI** (chloroforme alcool isoamylique 24/1-v/v) puis est **agité** manuellement jusqu'à formation d'une émulsion.

→Centrifuger ensuite à **16000g** pendant **10 min**, température maintenue à **+4°C**. Cette étape permet l'élimination des traces de phénol.

## E. Précipitation des acides nucléiques

### Précipitation à l'isopropanol

→Transférer la phase aqueuse supérieure dans un microtube de **1,5 mL** (bout conique), homogénéiser. Si le **volume** de cette phase **excède 750 µL**, la répartir dans un ou deux autres tubes de 1,5 mL. Distribuer plutôt des **volumes égaux** si deux tubes de 1,5 mL sont utilisés.

→Ajouter à chaque tube un **volume égal d'isopropanol** puis homogénéiser doucement le mélange.

→Incuber à **température ambiante** pendant au minimum **30 min**.

→Centrifuger le tout à **16 000g** pendant au minimum **15 min** à **+4°C**.

## F. Lavage du culot :

→Éliminer le surnageant et laver chaque culot avec **500 µL (ou 300 µL *précipitation éthanol/acétate de K*) d'éthanol 70% froid** (produit à maintenir dans la glace). Imprimer au tube un léger mouvement de balancier pour laver le culot sans le désagréger.

→Centrifuger à **16000g** pendant **10 min** (température **+4°C**).

→Éliminer l'alcool, utiliser éventuellement une pipette à cône fin, veiller à ne pas perdre de culot.

→Si l'ARN est soumis à immédiatement à une purification sur une membrane de silice de type **RNeasy mini kit, QUIAGEN, USA** l'étape de séchage n'est pas réalisée puisque de l'éthanol est rajouté systématiquement au culot avant le dépôt sur colonne.

## G. Traitements des acides nucléiques :

### 1 Purification des acides nucléiques isolés



## ARN

Utilisation du kit **RNeasy mini kit QIAGEN** et application du protocole de purification des acides ribonucléiques (cf page 56 à 57 du RNeasy® Mini Handbook Avril 2006)

### Protocol: RNA Cleanup

The RNeasy Mini Kit can be used to clean up RNA previously isolated by different methods or after enzymatic reactions, such as labeling or DNase digestion. Determining the correct amount of starting material. A maximum of 100 µg RNA can be cleaned up in this protocol. This amount corresponds to the RNA binding capacity of the RNeasy spin column.

#### **Important points before starting :**

If using the RNeasy Kit for the first time, read “Important Notes” (page 18). If working with RNA for the first time, read Appendix A (page 63). Buffer RLT may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming, and then place at room temperature (15–25°C). Buffer RLT contains a guanidine salt and is therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach. See page 8 for safety information. Perform all steps of the procedure at room temperature. During the procedure, work quickly. Perform all centrifugation steps at 20–25°C in a standard microcentrifuge. Ensure that the centrifuge does not cool below 20°C.

#### **Things to do before starting**

\*Buffer RPE is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 4 volumes of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.

\*If performing optional on-column DNase digestion, prepare DNase I stock solution as described in Appendix D (page 69).

#### **Procedure**

**1.** Adjust the sample to a volume of 100 µl with RNase-free water. Add 350 µl Buffer RLT, and mix well.

**2.** Add 250 µl ethanol (96–100%) to the diluted RNA, and mix well by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 3.

**3.** Transfer the sample (700 µl) to an RNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at 8000 x g (↔10,000 rpm). Discard the flow-through.

\* Flow-through contains Buffer RLT and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

Use again the collection tube in step 4.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Optional: If performing optional on-column DNase digestion (see “Eliminating genomic DNA contamination”, page 23), follow steps D1–D4 (page 69) after performing this step.

**4.** Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at 8000 x g (↔10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through. Use again the collection tube in step 5.

**Note:** Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see “Things to do before starting”).



5. Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at 8000 g (↔10,000 rpm) to wash the spin column membrane. The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

**Note:** After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

6. Optional: Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Close the lid gently, and centrifuge at full speed for 1 min. Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 5.

7. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 µl RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at 8000 x g (10,000 rpm) to elute the RNA.

8. If the expected RNA yield is >30 µg, repeat step 7 using another 30–50 µl RNasefree water, or using the eluate from step 7 (if high RNA concentration is required). Use again the collection tube from step 7. If using the eluate from step 7, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

## ADN

Utilisation du kit **NucleoSpin®Tissue Macherey-Nagel GmbH & Co, Germany.**

### Réactifs de purification utilisés :

:

- **Tampon B3 :** Tampon à reconstituer avant utilisation à partir du **tampon B1** et du **réactif B2**. Transvaser la totalité du tampon B1 dans le flacon du réactif B2. Bien mélanger. La **solution B3** se conserve à température ambiante et est stable pendant un an.
- **Ethanol 100% (v/v) : non fourni avec le kit.**  
Ethanol Absolu C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O Normapur VWR™ prolabo, France. LOT 0602714  
PM = 46,07 d° = 99,8%
- **Colonne de purification Mini Spin Column®**
- **Tampon BW** prêt à l'emploi
- **Tampon B5 :** Tampon concentré à compléter avec de l'**éthanol 100% (v/v)** au volume indiqué sur le bouchon du flacon. Le volume à ajouter est 4 fois celui du tampon B5 concentré.
- Tampon BE (**Tampon Tris 5 mM pH 8.5**) = **tampon d'éluion de l'ADN**  
tampon à utiliser à +70°C de préférence.
- **Eau Ultra-Pure : non fournie dans le kit**  
A utiliser comme éluant de l'ADN à la place du tampon BE.

### • Purification de l'ADN (Kit NucleoSpin®Tissue)

Le protocole du fournisseur a été modifié notamment en ce qui concerne les vitesses de centrifugation.

### Ajustement des conditions d'adsorption ADN/silice :



- Ajouter **200µL** de « Buffer **B3** » (tampon B3)
- Vortexer énergiquement pendant 15 s.
- Incuber **10 min** à **+70°C** (bain-marie).
- Vortexer brièvement.
- Ajouter **210 µL d'éthanol absolu**.
- Vortexer **15 s**

*(Après addition d'éthanol, un précipité filandreux peut être visible. Cela n'affectera pas la purification si l'on veille à déposer sur la colonne la totalité du précipité)*

### Adsorption de l'ADN :

- Pour chaque échantillon, placer une micro-colonne dans un tube collecteur de 2 mL (fourni). Transvaser la totalité de la préparation sur la micro-colonne **Mini Spin Column®**.
- Centrifuger **1 à 2 min** à **13 500 rpm**.
- Eliminer le filtrat et replacer la micro-colonne dans le tube collecteur.

### Lavage de la membrane de silice :

- Ajouter **500 µL** de tampon **BW**
- Centrifuger **2 min** à **13 500 rpm**
- Eliminer le filtrat et replacer la micro-colonne dans le tube collecteur.
  
- Ajouter **600 µL** de « Buffer **B5** » (tampon B5)
- Centrifuger **2 min** à **13.500 rpm**
- Eliminer le filtrat.

### Séchage de la membrane de silice :

- Mettre la colonne dans un **tube de 1.5 ml** au bouchon coupé.
- Centrifuger pendant **1 min** à **13500 rpm** afin d'éliminer l'alcool résiduel.

### Elution de l'ADN :

- Placer la microcolonne dans un nouveau tube Eppendorf™ de 1,5 mL (à bouchon coupé ou non selon la configuration du plateau de la centrifugeuse)

Plusieurs alternatives d'élution peuvent être testées :

- Ajouter **50 µL** d'eau **UP\***
- Incuber à **température ambiante** pendant **5 min**.
- Centrifuger **1 min** à **16 700 g↔13 000 rpm**
- Récupérer le filtrat dans un tube de **2 ml à vis**

*Protocole  
Narbonne*

**Ou**

- Ajouter **50 µL** de **tampon BE\*** (Elution buffer ou Tampon Tris 5 mM pH 8.5) préchauffé à **+70°C**.
- Incuber à **température ambiante** pendant **cinq minutes**
- Centrifuger **1 min** à **13 500 rpm**
- Récupérer le filtrat dans un tube Eppendorf™ de 1,5 µL.



(\*Alternative retenue pour les sols de la Réunion.)

Dans les deux cas, doser l'ADN par spectrophotométrie UV (Nanodrop®) et par fluorescence (Quant It™ Picogreen® » Molecular Probes INVITROGEN, UK). Un contrôle de la qualité de l'extraction par électrophorèse sur gel d'agarose 1% doit aussi être réalisé. Le rapport des concentrations [NANO]/[PICO] permet d'apprécier la pureté de l'extrait. Placer rapidement les solutions d'extraction à  $-20^{\circ}\text{C}$  en aliquotant

## H. Electrophorèse sur gel d'agarose 1,2% :

Dans un premier temps, une électrophorèse sur l'extrait brut peut être effectuée. Elle s'effectue sur gel d'agarose réservé à l'ARN (agarose SIGMA ALDRICH type II Médium EEO) à 1,2 % préparé à partir d'un tampon TBE RNase-free (Tris Borate EDTA) 0,5% **pH 8.3** (TBE 10X EUROMEDEX, France) comme suit :

→pour 2 gels de 17 puits (2X50 mL) prévoir: 5 mL de tampon TBE 10X + 95 mL d'eau RNase-free,

→ajouter 1,2 g d'agarose

→Faire dissoudre l'agarose au four micro-onde (salle 413) pendant 2 minutes en interrompant le chauffage dès qu'il y a formation de bulles afin d'éviter l'évaporation de la solution et sa concentration. Mettre chaleur moyenne (2) et vérifier l'absence de cristaux.

→Lorsque le mélange ne présente aucune cristallisation, le refroidir en passant le bécher sous l'eau froide jusqu'à obtention d'une température de  $+45^{\circ}\text{C}$  à  $+50^{\circ}\text{C}$ .

→A ce moment rajouter le réactif **BET (10 mg/mL)** (ERBA CARLO REAGENTI, Italie LOT V3E476053E) :

**5  $\mu\text{L}$  de BET pour 100 mL** ce qui correspond à une concentration finale dans le gel de **0,5  $\mu\text{g/mL}$**

→Couler le gel dans les moules qui contiennent les peignes destinés aux petits puits. Laisser 3 mm entre le gel et le sommet des puits.

→Oter les bulles avec le dos d'un cône de pipettes. Laisser le gel se polymériser à température ambiante pendant une heure.

→Après polymérisation le gel est soit utilisé immédiatement, soit conservé à  $+4^{\circ}\text{C}$  en tampon 0,5X (tampon RNase-free), le gel doit y être totalement immergé.

→**5  $\mu\text{L}$  de solution de dépôt** sont mélangés avec **5  $\mu\text{L}$  d'extrait d'ARN ou ARN/ADN**, homogénéisés puis déposés dans un puits.

→un marqueur de taille le ladder DNA 1Kb+ (INVITROGEN life technologies, USA) est également déposé à un volume de **5  $\mu\text{L}$**

→la migration s'effectue en cuves Emblitec Run One® Electrophoresis Cell (tampon TBE 0,5X) sous un voltage de **100V** jusqu'à une petite moitié de distance de migration du tampon de dépôt qui sert de témoin de migration.

→la **révélation** s'effectue sous **lumière ultraviolette** en liaison avec un appareil de photographie et un logiciel de traitement des données (Caméra, Vilber Lourmat, France ; logiciel : Biocapture MV).





## **RESUME**

Le pastoralisme dans les prairies subalpines en tête de bassin versant représente un risque potentiel de pollution microbiologique fécale des sols et de l'eau. L'impact des pratiques pastorales sur la qualité des sols et au-delà sur les aquifères récepteurs mérite d'être étudié dans les contextes où s'élabore une part essentielle des ressources en eaux. L'objectif général de ce travail est d'améliorer les connaissances sur l'écologie et les facteurs de contrôle de la dispersion et du transfert d'*Escherichia coli*, dans les sols et bassins versants des écosystèmes pastoraux. Des techniques de microbiologie pasteurienne (dénombrement des populations) et de biologie moléculaire (état physiologique et structure génétique des populations) sont mises en œuvre pour étudier le devenir des bactéries dans différents niveaux d'organisation du système Bassin Versant : bouses, sols et eau. L'horizon rhizosphérique de surface du sol (0-5 cm) s'est révélé être un réservoir environnemental permanent en *E. coli* ( $10^3$  à  $10^4$  cellules  $g^{-1}$  de sol sec), quel que soit la saison et la station pastorale considérées, suggérant la naturalisation de populations d'*E. coli*. Plus en profondeur (5-25 cm), l'abondance d'*E. coli* est mise en relation avec l'hydrodynamique des sols (sol drainant et ouvert, sol saturé et confiné). La structure génétique des populations d'*E. coli* répond de façon similaire. Dans l'eau, les populations d'*E. coli* détectées ont des similitudes fortes avec celles des bouses déposées sur l'alpage et celles localisées dans les sols drainants connectés aux aquifères. Enfin, plusieurs marqueurs de l'état physiologique d'*E. coli* ont été sélectionnés et des outils moléculaires élaborés. L'ensemble de ces résultats est discuté sur le plan de la valeur indicatrice d'*E. coli* et de son comportement dans les sols de prairies pâturées.

Mots-clés : *Escherichia coli*, contamination fécale, bassin versant, sol, hydrodynamique, réservoir, adaptation, structure génétique

---

## **ABSTRACT**

Grazing in subalpine pasturelands located in watershed heads represents a potential risk in terms of fecal microbiological pollution of both soil and water. Hence, the role of pastoral practices on soils and aquifers quality needs to be evaluated. The general goal of this work is to provide deeper knowledge on *E. coli* ecology in dairy alpine grassland soils and on controlling factors of *E. coli* in the environment. Microbiological analyses and molecular biology are carried out to evaluate the behaviour of *E. coli* populations in cow pats, soils and water (throughout the estimation of populational abundance and physiological status as well as genetic structure). The rhizosphere soil (0-5 cm) is showed to be a permanent environmental reservoir of *E. coli* populations ( $10^4$  cells  $g^{-1}$  dry soil) whatever the season or the pasture unit. This result raises the possibility that fecal *E. coli* could constitute a naturalized (sub)population, which is now part of the indigenous soil community of alpine pasture grasslands. In deeper soil layer below the root zone (5-25 cm), the abundance of *E. coli* is directly correlated to soil hydrodynamic as does the population genetic structure. In water, *E. coli* populations are closely related to those from cow pats and from well-drained soils, connected to aquifers. Also, molecular markers have been elaborated to purchase *E. coli* physiological state. These results are discussed in terms of the indicator value of *E. coli* and of its behaviour in soils of pasture grasslands.

Key-words: *Escherichia coli*, fecal contamination, soil, watershed, hydrodynamic, reservoir, adaptation, genetic structure



## **RESUME**

Le pastoralisme dans les prairies subalpines en tête de bassin versant représente un risque potentiel de pollution microbiologique fécale des sols et de l'eau. L'impact des pratiques pastorales sur la qualité des sols et au-delà sur les aquifères récepteurs mérite d'être étudié dans les contextes où s'élabore une part essentielle des ressources en eaux. L'objectif général de ce travail est d'améliorer les connaissances sur l'écologie et les facteurs de contrôle de la dispersion et du transfert d'*Escherichia coli*, dans les sols et bassins versants des écosystèmes pastoraux. Des techniques de microbiologie pasteurienne (dénombrement des populations) et de biologie moléculaire (état physiologique et structure génétique des populations) sont mises en œuvre pour étudier le devenir des bactéries dans différents niveaux d'organisation du système Bassin Versant : bouses, sols et eau. L'horizon rhizosphérique de surface du sol (0-5 cm) s'est révélé être un réservoir environnemental permanent en *E. coli* ( $10^3$  à  $10^4$  cellules  $g^{-1}$  de sol sec), quel que soit la saison et la station pastorale considérées, suggérant la naturalisation de populations d'*E. coli*. Plus en profondeur (5-25 cm), l'abondance d'*E. coli* est mise en relation avec l'hydrodynamique des sols (sol drainant et ouvert, sol saturé et confiné). La structure génétique des populations d'*E. coli* répond de façon similaire. Dans l'eau, les populations d'*E. coli* détectées ont des similitudes fortes avec celles des bouses déposées sur l'alpage et celles localisées dans les sols drainants connectés aux aquifères. Enfin, plusieurs marqueurs de l'état physiologique d'*E. coli* ont été sélectionnés et des outils moléculaires élaborés. L'ensemble de ces résultats est discuté sur le plan de la valeur indicatrice d'*E. coli* et de son comportement dans les sols de prairies pâturées.

Mots-clés : *Escherichia coli*, contamination fécale, bassin versant, sol, hydrodynamique, réservoir, adaptation, structure génétique

---

## **ABSTRACT**

Grazing in subalpine pasturelands located in watershed heads represents a potential risk in terms of fecal microbiological pollution of both soil and water. Hence, the role of pastoral practices on soils and aquifers quality needs to be evaluated. The general goal of this work is to provide deeper knowledge on *E. coli* ecology in dairy alpine grassland soils and on controlling factors of *E. coli* in the environment. Microbiological analyses and molecular biology are carried out to evaluate the behaviour of *E. coli* populations in cow pats, soils and water (throughout the estimation of populational abundance and physiological status as well as genetic structure). The rhizosphere soil (0-5 cm) is showed to be a permanent environmental reservoir of *E. coli* populations ( $10^4$  cells  $g^{-1}$  dry soil) whatever the season or the pasture unit. This result raises the possibility that fecal *E. coli* could constitute a naturalized (sub)population, which is now part of the indigenous soil community of alpine pasture grasslands. In deeper soil layer below the root zone (5-25 cm), the abundance of *E. coli* is directly correlated to soil hydrodynamic as does the population genetic structure. In water, *E. coli* populations are closely related to those from cow pats and from well-drained soils, connected to aquifers. Also, molecular markers have been elaborated to purchase *E. coli* physiological state. These results are discussed in terms of the indicator value of *E. coli* and of its behaviour in soils of pasture grasslands.

Key-words: *Escherichia coli*, fecal contamination, soil, watershed, hydrodynamic, reservoir, adaptation, genetic structure