

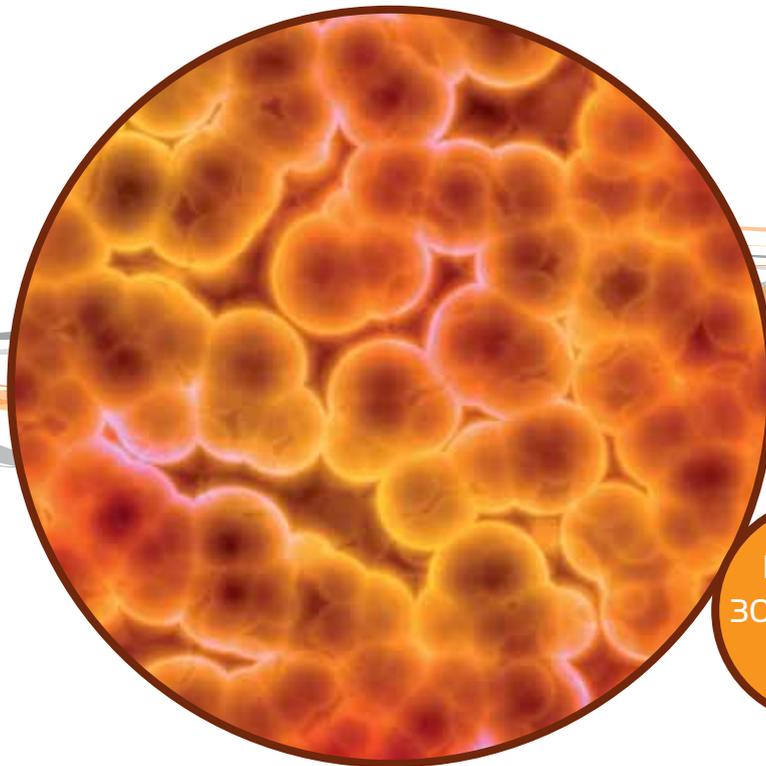


# Les rencontres scientifiques de l'Anses

Restitution du programme national  
de recherche environnement santé travail

## DOSSIER DU PARTICIPANT

De l'émergence à la résurgence des agents biologiques :  
caractérisation des facteurs de risque pour l'homme



Mercredi  
30 novembre  
2011

# SOMMAIRE

**EDITORIAL** ..... 4

## **SESSION 1**

Etudes des risques liés aux agents biologiques  
présents dans différents milieux ..... 5

## **CONFÉRENCE INVITÉE**

Écologie et évolution des maladies transmissibles. L'importance de l'approche  
intégrative..... 14

## **SESSION 2**

Méthodes d'évaluation de l'exposition  
et de la contamination..... 15

## **SESSION 3**

Écologie et maîtrise de la résistance  
aux antibiotiques..... 21

**POSTERS** ..... 27

Depuis l'ère pasteurienne, le XX<sup>e</sup> siècle a vu progressivement décliner la prévalence des maladies infectieuses. L'avancée des connaissances scientifiques et des progrès techniques considérables ont conduit à croire que ces maladies seraient vaincues. Cependant, ces vingt dernières années, une augmentation de l'incidence et de la prévalence des maladies infectieuses est observée ainsi qu'une hausse du nombre d'agents biologiques émergents ou réurgents. Parallèlement, le phénomène de résistance aux antimicrobiens et les échecs thérapeutiques associés prennent de l'ampleur. Le récent épisode d'intoxication alimentaire à grande échelle en Allemagne liée à une nouvelle bactérie « *E. Coli* » particulièrement pathogène retrouvée dans des graines germées nous rappelle l'importance de l'enjeu de santé publique.

La caractérisation fine des nouveaux agents biologiques, des réservoirs d'agents anciens et nouveaux, de leur diffusion, de scénarios d'exposition, de mécanismes et facteurs de risque de l'hôte, de l'impact des mesures des soins, de prévention, ou encore des mécanismes de résistance sont autant de connaissances nécessaires à la prévention ou à la réduction des risques sanitaires.

L'Anses coordonne et anime le programme national de recherche en environnement santé travail (PNR-EST), qui vise à produire les connaissances scientifiques nécessaires à l'évaluation et à la prévention des risques, aussi bien d'origine microbiologique que physico-chimique.

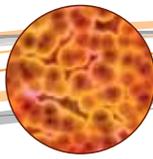
Pour favoriser la dissémination de ces nouvelles connaissances l'Anses organise, deux fois par an, une journée de restitution des résultats des projets.

Dans ce cadre, la journée du 30 novembre 2011 est consacrée à la caractérisation des facteurs de risque pour l'homme associés à l'émergence et à la résurgence des agents biologiques. Son objectif est de mettre en perspective les connaissances nouvellement acquises et de discuter des questionnements liés à l'évaluation des risques par le dialogue direct entre chercheurs et acteurs de la sécurité sanitaire.

Que cette journée puisse contribuer à « apprivoiser » le risque biologique, « compagnon fidèle, pesant et redoutable de l'humanité »<sup>1</sup>

**Marc MORTUREUX**  
Directeur général de l'Anses

<sup>1</sup>Citation de Marcel Merlin, médecin général inspecteur, direction régionale du Service de santé des armées, Lyon



# Etudes des risques liés aux agents biologiques présents dans différents milieux

SESSION 1

### **Lionel MOULIN**

*Chef de la Mission risques environnement santé. Ministère de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement. Commissariat général au développement durable. Direction de la recherche et de l'innovation*

Docteur-ingénieur en chimie de la pollution de l'université Paris 7, Lionel MOULIN est responsable de la mission risques environnement santé au service de la recherche du ministère en charge de l'environnement. Dans les domaines de la recherche et sur les thèmes des risques naturels, technologiques et des risques « environnement-santé », il assure le lien avec les autres ministères, en particulier le ministère de la recherche, et le suivi de l'activité recherche des établissements. Lionel MOULIN pilote également les programmes de recherche du ministère sur les thèmes environnement-santé, notamment le programme national de recherche sur les perturbateurs endocriniens (PNRPE), le programme Primequal sur la qualité de l'air et le programme sur les risques liés aux OGM. Le service de la recherche conduit également le programme Pesticides et le programme Repere qui travaille sur le dialogue entre sciences et société.

### **Laurent LALOUX**

*Anses - Directeur du Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort*

Ingénieur AgroParisTech avec une expérience de 10 ans dans la mise en valeur des qualités nutritionnelles et organoleptiques des denrées alimentaires et notamment des produits laitiers. Il a consacré les 10 dernières années de sa carrière à l'étude de dangers apportés par l'alimentation, dangers biologiques ou chimiques ayant un impact sur la santé des consommateurs. Depuis 2007, il est à la direction du Laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses. Il est expert français auprès du Codex et de la Commission européenne, DG Agri, DG Sanco ainsi qu'auprès d'organismes de normalisation (Afnor, ISO, CEN), directeur de laboratoires de référence de l'Union européenne et membre du conseil d'administration de l'Actia et du conseil scientifique d'Actilait.

# Survie des oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans un aquifère en milieu karstique et les eaux de surface : rôle des biofilms et hétérotrophes microbiens

**Jean-Paul DUPONT**<sup>1</sup>, Gilles GARGALA<sup>2</sup>, Samira KHALDI<sup>2</sup>, Laetitia LE GOFF<sup>2</sup>, Amer MOUHRI<sup>3</sup>, Nicolas MASSÉI<sup>1</sup>, Loïc FAVENNEC<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UMR 6143 M2C, université de Rouen ; <sup>2</sup>Laboratoire de parasitologie, CHU et université de Rouen

## BIOGRAPHIE

Jean-Paul DUPONT est professeur en géosciences, UMR 6143 morphodynamique continentale et côtière, responsable du projet structuré TEQQ (Transfert, Eau, Qualité, Quantité) de la FED SCALE, université de Rouen. Spécialisé en hydrologie et transferts particuliers dans les hydrosystèmes continentaux, Jean-Paul DUPONT a reçu aussi une formation en biologie, sédimentologie. Ces actuels travaux en hydrogéologie présentent l'originalité de coupler des chroniques de haute fréquence de conductivité électrique et de turbidité avec la caractérisation des matières en suspension. Ces recherches sont destinées à quantifier les processus de transfert (y compris transport des micro-organismes libres ou fixés) tant en hydrologie souterraine que de surface et à quantifier les parts : du transfert direct, de dépôt et de remobilisation intrakarstique.

## RÉSUMÉ

### Introduction

En Haute-Normandie, les ressources en eau potable proviennent de l'exploitation des eaux souterraines de l'aquifère de la craie de l'Ouest du bassin de Paris qui correspond à une nappe libre sous couverture de formations superficielles. Son fonctionnement hydrologique est mixte, caractérisé par des écoulements de type poreux fissuré, drainés par des conduits karstiques. Au niveau des plateaux, les eaux de ruissellement et d'infiltration peuvent être contaminées par les oocystes de *Cryptosporidium* spp., provenant des bovins et des rejets domestiques, avant de s'engouffrer au niveau des dolines ou bétoires puis de transiter rapidement vers les exutoires karstiques, exploités en vallée. Ce travail a pour but d'analyser les potentiels de piégeage, de transport et de survie des oocystes dans le contexte des écoulements karstiques de l'aquifère de la craie.

### Méthode

La stratégie d'échantillonnage a été organisée selon deux voies : 1) une recherche des oocystes à l'échelle de la Haute-Normandie sur près de 50 sites d'exploitation des ressources en eau et, 2) le suivi hydrologique et des dénombrements d'oocystes sur deux sites ateliers (Fontaine-sous-Préaux et le continuum perte-source-forage de Norville, connecté avec la Seine soumis à l'influence des marées). Les eaux brutes et traitées, prélevées *in situ*, sont filtrées sur des cartouches « Envirochek ». La recherche et le dénombrement des oocystes de *Cryptosporidium* spp. ont été réalisés au microscope à épifluorescence avec, partiellement, une confirmation par cytométrie en flux. L'infectiosité a été étudiée après inoculation des oocystes chez le souriceau immunocompétent NMRI.

### Résultats

Dans le cadre régional, la probabilité de présence d'oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans les eaux brutes augmente avec le nombre de prélèvements et le taux d'infectiosité est significatif. Les taux de restitution d'oocystes ne peuvent être corrélés avec la turbidité des eaux et les indicateurs bactériens mais apparaissent plus dépendants ou 1) de la pression d'exploitation des eaux souterraines (alimentation des plus grosses collectivités) et, 2) de l'augmentation des gradients hydrauliques dans les bassins versants d'alimentation des captages et/ou forages. Ces données sont confirmées par les résultats obtenus dans le continuum perte-source-forage de Norville. Les prélèvements réalisés dans ce continuum permettent de mettre en évidence : 1) les processus de décantation et de remise en suspension des oocystes, 2) l'augmentation des restitutions pendant les périodes de pompage de longue durée et, 3) l'influence du forçage hydraulique tidal sur la restitution d'oocystes.

### Conclusion

Les ressources karstiques de l'aquifère de la craie sont globalement vulnérables à la restitution d'oocystes de *Cryptosporidium* spp., plus ou moins infectieux. En réponse aux épisodes pluvieux, la turbidité constitue un indicateur du transport de particules mais ne traduit pas le taux de restitution d'oocystes. Au cours des transports intrakarstiques, les compétitions interspécifiques et le piégeage dans les conduits karstiques sont insuffisants pour juguler un danger sanitaire qui est amplifié par l'impact des exploitations et l'augmentation des gradients hydrauliques naturels de l'aquifère. Enfin, dans l'identification des risques parasitaires dans les eaux souterraines, l'échantillonnage aléatoire doit être abandonné au profit d'une stratégie fondée sur une bonne connaissance du fonctionnement hydrologique de l'aquifère étudié.

*Projet 2006-30, réalisé entre janvier 2007 et juillet 2010.*

## Dynamique de la contamination environnementale par les oocystes de *Toxoplasma gondii*

**Emmanuelle GILOT-FROMONT**<sup>1</sup>, Maud LELU<sup>2</sup>, Dominique AUBERT<sup>3</sup>, Cécile GOTTELAND<sup>3</sup>, Agnès RICHAUME-JOLION<sup>4</sup>, Eve AFONSO<sup>5</sup>, Marie-Laure DARDE<sup>6</sup>, Benjamin RICHE<sup>7</sup>, Marie-Lazarine POULLE<sup>3</sup>, Muriel RABILLOUD<sup>7</sup>, Isabelle VILLENA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UMR CNRS 5558 et VetAgro Sup, Lyon ; <sup>2</sup>NIMBioS, Knoxville, Tennessee (USA) ; <sup>3</sup>EA3800, université de Reims ; <sup>4</sup>UMR CNRS 5557, université Lyon 1 ; <sup>5</sup>UMR6249, université de Franche-Comté ; <sup>6</sup>EA 3174, université de Limoges ; <sup>7</sup>UMR CNRS 5558, université Lyon 1

### BIOGRAPHIE

Emmanuelle GILOT-FROMONT est professeur en épidémiologie, UMR CNRS 5558 et VetAgro Sup, Lyon ; doctorat de l'école vétérinaire de Lyon ; doctorat de l'université Lyon 1. Emmanuelle GILOT-FROMONT travaille en combinant des approches d'observation de terrain, d'expérimentation et de modélisation dynamique. Ses recherches visent à mesurer les variations de la compétence immunitaires, leurs causes et leurs conséquences sur la dynamique hôte-pathogène.

## RÉSUMÉ

### Introduction

*Toxoplasma gondii* est un protozoaire, agent d'une zoonose mondialement répandue. Le cycle du parasite est complexe et possède une phase dans le milieu extérieur : les oocystes produits par les chats sporulent dans le milieu extérieur et peuvent y survivre, être transportés par l'eau et la microfaune du sol. La contamination environnementale est non seulement à l'origine de l'infection des hôtes intermédiaires (qui peuvent aussi acquérir l'infection par voie verticale ou par carnivorisme), mais elle est aussi responsable d'une part importante des cas humains. Or, le niveau de contamination environnementale et sa distribution spatiale sont mal connus. Notre objectif est de mieux comprendre la dynamique de cette phase par une approche intégrative associant études de terrain et expérimentations. Dans ce cadre, le projet associe des parasitologues et des épidémiologistes dans l'objectif d'améliorer les outils et l'estimation des paramètres de la dynamique de contamination environnementale.

### Méthode

Deux séries d'expérimentations ont été menées au laboratoire. La première visait à améliorer la sensibilité de la méthode de détection des oocystes par PCR en comparant différents protocoles de dispersion, de concentration, de centrifugation et d'extraction de l'ADN. Différents types de sols (4 sols naturels et 4 sols reconstitués) et d'oocystes (sporulés ou non, d'âges variés) ont aussi été comparés. La deuxième série d'expériences consistait à mesurer la survie des oocystes dans le sol (durant 22 mois dans deux bacs de sol humide et sec) et dans l'eau (au fil du temps et en fonction de l'application de rayonnement UV et d'ozone). Dans les deux cas, la recherche des oocystes a été réalisée par comptage, par détection moléculaire et *in vivo*, ce qui permet de comparer les résultats obtenus.

### Résultats

Dans la première série d'expériences, la sensibilité de la méthode de détection des oocystes a été améliorée d'un facteur 10, en modifiant la méthode de concentration à partir du protocole initialement proposé. Dans le sol, la survie moyenne d'un oocyste est estimée à 42 jours en sol sec et à 137 jours en sol humide, mais des oocystes viables sont détectables plus de 400 jours après le début de l'expérimentation. L'étude de survie a aussi permis de montrer une excellente corrélation entre la concentration d'oocystes dans le sol estimée par PCR et la dose permettant d'infecter 50 % des souris, ce qui valide l'utilisation de la PCR comme méthode d'estimation de l'infectiosité des sols contaminés. L'inactivation des oocystes dans l'eau a donné des résultats variables : l'irradiation UV à 40 mJ/cm<sup>2</sup> permet d'obtenir un abattement de 4,5 log, alors que l'exposition à l'ozone de 9,4 mg.min/l n'a pas permis d'inactiver les oocystes.

### Conclusion

Ce travail a d'abord permis d'améliorer les outils de mesure de la contamination environnementale. A la suite de ce travail, nous avons entrepris une étude de la contamination des sols en milieu rural, et de sa variabilité spatiale à l'échelle d'un village. D'autre part, ce projet apporte des informations qui sont actuellement utilisées dans le cadre d'un travail de modélisation mathématique de la dynamique de *Toxoplasma gondii*. L'ensemble de ces recherches apporte une meilleure connaissance du risque d'infection par *Toxoplasma gondii* à partir de l'environnement, et des mesures de gestion possibles de ce risque, notamment pour le traitement des eaux.

*Projet 2006-1-51, réalisé entre janvier 2007 et janvier 2010.*

## *Escherichia coli* O104/H4 : l'énigme d'une crise

### **Sonia TENAILLEAU**

*Anses - Chef d'unité de l'évaluation des risques biologiques dans les aliments, direction de l'évaluation des risques*

### **BIOGRAPHIE**

Sonia TENAILLEAU, ingénieur agro-alimentaire, chef de l'unité de l'évaluation des risques biologiques dans les aliments de la direction de l'évaluation des risques de l'Anses, est en charge de l'organisation, du pilotage et du suivi de l'expertise scientifique concernant les risques relatifs aux OGM, enzymes, agents des EST et agents biologiques.

### **RÉSUMÉ**

A partir du 22 juin 2011, des cas de diarrhées hémorragiques et de syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) se sont déclarés chez des adultes, majoritairement des femmes, dans la région de Bordeaux. Ces personnes ont été infectées par une souche d'*Escherichia coli* appartenant au sérotype O104/H4, une bactérie génétiquement liée à celle responsable de l'épidémie déclarée en Allemagne en mai 2011. L'investigation épidémiologique menée en France a permis d'identifier très rapidement la source de cette contamination : la consommation de graines germées (fenugrec notamment) à l'occasion d'une kermesse début juin.

La proximité des épisodes en Allemagne puis en France, et leurs points communs (même souche de bactérie, jusqu'à présent très rarement apparue dans des cas d'intoxication, même origine suspectée de graines germées) conduisent à s'interroger sur l'existence d'une source commune de contamination. Une enquête de traçabilité, coordonnée par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a mis en évidence un lien avec la consommation de graines importées d'Égypte (rapport publié le 5 juillet 2011).

La Commission européenne a pris la décision, le 5 juillet 2011, de retirer du marché, puis analyser et détruire l'ensemble des lots de graines de fenugrec importées en Europe entre 2009 et 2011 par un exportateur égyptien. Cette décision prévoit également de suspendre jusqu'au 31 octobre 2011 les importations de graines et de fèves égyptiennes destinées à la germination. Dans ce contexte, l'Anses s'est autosaisie pour faire un point sur l'état des connaissances liées à l'épisode bordelais et ses points communs avec l'épisode allemand.

Trois mois après cette épidémie, des questions restent en suspens, les investigations menées butent sur plusieurs difficultés.

## La trypacidine, une toxine véhiculée par les spores d'*Aspergillus fumigatus*

**Thierry GAUTHIER**, Xiaodi WANG, Joice SIFUENTES DOS SANTOS, Athanasios FYSIKOPOULOS, Souria TADRIST, Cécile CANLET, Marie-Pierre ARTIGOT, Nicolas LOISEAU, Isabelle P. OSWALD, Olivier PUEL

Toxalim, UMR 1331 INRA/INP de Toulouse

### BIOGRAPHIE

Thierry GAUTHIER, ingénieur INSA (Institut national des sciences appliquées) et docteur en physiologie cellulaire est actuellement le responsable de la plateforme imagerie de l'unité Toxalim. Il travaille au sein d'une équipe dédiée exclusivement à l'étude des toxines produites par les espèces fongiques contaminant les denrées alimentaires mais aussi tout substrat non alimentaire susceptible, de par la présence de champignons, d'engendrer un risque sanitaire. Ses activités principales sont l'étude des effets toxiques par des approches d'imagerie cellulaire (cytométrie, microscopie).

### RÉSUMÉ

#### Introduction

*Aspergillus fumigatus* a la capacité de coloniser divers substrats tels que les matières premières agricoles, les composts ou les vieux papiers. Outre le risque alimentaire parfaitement identifié depuis plusieurs décennies, le risque par inhalation des spores s'avère être une voie importante de contamination entraînant des problèmes de santé publique. *Aspergillus fumigatus* est réputée produire un grand nombre de métabolites secondaires et la toxicité de la majorité d'entre eux n'a toujours pas été évaluée.

#### Méthode

L'approche méthodologique a consisté dans un premier temps à identifier les métabolites produits par *A. fumigatus* sur différents substrats : synthétiques (milieu de cultures), naturels (grains de céréales) par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Après extraction par solvants organiques des mycotoxines ainsi produites, fractionnement des extraits bruts, des tests de cytotoxicité *in vitro* ont permis d'identifier les composés biologiquement actifs. Ces composés après purification ont été confirmés par spectrométrie de masse ultra-haute résolution et par RMN. L'effet cytotoxique de ces extraits a été testé sur deux systèmes cellulaires issus du tractus respiratoire : lignée A549, cellules épithéliales alvéolaires humaines et HBEpC, cellules primaires bronchiales humaines. L'effet de la trypacidine sur le stress oxydatif, le cycle cellulaire et l'apoptose a été étudié par cytométrie de flux.

#### Résultats

Nous avons montré que parmi les métabolites véhiculés par les spores d'*Aspergillus fumigatus*, seule la trypacidine présente une toxicité importante vis-à-vis d'une lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines (A549). Nous avons produit et purifié cette toxine à partir de culture d'*A. fumigatus* sur blé pour étudier son effet toxique sur la lignée A549. L'IC50 de la trypacidine relatif à son effet sur la viabilité cellulaire et sur la lyse cellulaire est identique (7,4  $\mu$ M).

Une exposition des cellules A549 à la trypacidine pendant une heure suffit pour conduire à la mort cellulaire dans les 24 heures suivantes. La trypacidine induit un stress oxydant (formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NO) dès les premières heures de contact, provoquant la nécrose cellulaire. Aucun effet sur le cycle cellulaire ni des signes indiquant l'enclenchement d'un processus apoptotique n'ont été observés, suggérant ainsi que la trypacidine déclenche des dommages irréparables à la cellule provoquant sa nécrose.

**Conclusion**

*Aspergillus fumigatus* reste surtout étudié comme pathogène opportuniste et non pas comme un organisme producteur de toxines inhalables. Cette approche a montré que les spores d'*A. fumigatus* portent principalement cinq mycotoxines dont seule la tryptacidine est cytotoxique pour des cellules pulmonaires. Depuis son identification en 1963 par Balan et *al.*, cette étude est la première démonstration de la cytotoxicité de la tryptacidine pour des cellules pulmonaires.

*Projet 2007-63, réalisé entre décembre 2007 et décembre 2009.*

## Épidémiologie descriptive des infections à cytomégalovirus, rubéole, varicelle, parvovirus B19 chez le personnel des crèches et halte-garderie en Isère

**Agathe BILLETTE DE VILLEMEUR**

*Centre départemental de santé, Grenoble*

**BIOGRAPHIE**

Agathe BILLETTE DE VILLEMEUR, médecin de santé publique et épidémiologiste, est spécialiste dans les champs de la vaccination, petite enfance et la médecine de prévention. Elle travaille actuellement comme médecin conseiller technique du recteur au rectorat de Grenoble.

**RÉSUMÉ****Introduction**

En France, la mise en évidence chez les travailleurs des crèches et haltes-garderies d'un risque professionnel d'infection par le cytomégalovirus (CMV), le parvovirus B19, les virus de la rubéole et de la varicelle, virus potentiellement graves pendant la grossesse, n'avait pas encore été clairement démontrée. Pour étudier cette question, un travail initié par le Conseil général de l'Isère et le Laboratoire de virologie du CHU de Grenoble, et co-financé par l'Anses, a été réalisé à partir de données objectives recueillies dans les crèches et haltes-garderies de l'Isère et comparées à celles de deux entreprises iséroises non exposées aux enfants.

Ce projet est issu de plusieurs équipes de santé publique, épidémiologique, virologique et médecins du travail : CHU, Conseil général de l'Isère, services du personnel des communes, service des médecines du travail du CEA et STM. Chaque équipe a été mise à contribution dans ses domaines de compétences, dans la mise en œuvre depuis le recueil des informations, les prélèvements, les analyses sérologiques et l'exploitation des résultats.

Les objectifs de l'étude étaient : estimer la séroprévalence des 4 virus : rubéole, cytomégalovirus, varicelle, parvovirus B19 chez les personnels féminins des structures collectives de garde d'enfants en Isère, âgés de 20 à 50 ans et la comparer à celle d'une population non exposée professionnellement aux enfants ; identifier les facteurs individuels ou professionnels, associés à la prévalence de l'infection à cytomégalovirus chez les professionnelles des structures collectives de garde d'enfants et estimer le nombre d'infections récentes à cytomégalovirus (< 6 mois) dans les deux populations.

**Résultats et discussion**

Pour la rubéole, les séroprévalences sont de 98,7 % chez les 395 exposées et 98,2 % chez les 382 non exposées, pour la varicelle elles sont respectivement de 100 et 99,7 %. Pour le parvovirus B19, elles sont respectivement de 79,4 et 68 % ; après ajustement, le risque professionnel du parvovirus, associé à l'exposition aux enfants est non significatif (RR = 1,05).

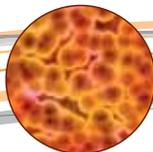
Concernant le CMV, aucune étude en France n'a établi le rôle du travail en crèches comme facteur de risque d'infection congénitale. Notre travail apporte des arguments sur la responsabilité de l'exposition professionnelle aux jeunes enfants, dans l'acquisition du CMV : d'une part, la séroprévalence est de 69,4 % chez les femmes exposées et 41,1 % chez les non-exposées avec un risque relatif ajusté de 1,43 et qui apparaît dès la première année d'exposition. D'autre part, quatre infections récentes ont été diagnostiquées chez les personnels de crèches et aucune chez les personnels non exposés. Les facteurs professionnels en cause sont la durée d'exposition aux enfants, les antécédents de travail en maternité et la réalisation de tâches de ménage ; le lavage des mains apparaît protecteur. Les facteurs de risque individuels identifiés sont le nombre d'enfants, leur garde en collectivité, l'exposition professionnelle du conjoint et la vie dans un pays à indice de développement humain moyen ou bas ; au contraire, la garde à domicile des enfants personnels est protectrice. Le calcul de la fraction attribuable à la profession dans la prévalence du CMV (30,1 %), non supérieure à certains facteurs de risque individuels, est également une donnée intéressante, pour les acteurs de santé publique et l'information des personnes concernées ; la corrélation avec les mesures d'hygiène appliquées, même si elle est limitée au lavage des mains et à la pratique du ménage peut permettre de remettre en avant l'intérêt des recommandations émises dans l'avis du 19 mars 2004 du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF).

**Conclusion**

D'autres études sont nécessaires pour étayer ce travail, mais ces premiers résultats incitent dès maintenant à poursuivre la réflexion débutée par le CSHPF sur les modalités de gestion des femmes enceintes travaillant en structures de garde d'enfants ; les médecins de santé au travail que nous avons rencontrés lors de cette étude, sont conscients du problème et demandeurs d'informations et de recommandations.

Nos résultats sur le parvovirus, obtenus à partir de personnel exposé essentiellement à des enfants de moins de trois ans ne permettent pas d'éliminer la réalité d'un risque pour d'autres catégories professionnelles. Une étude complémentaire chez des personnels en contact avec des enfants plus âgés serait intéressante.

*Projet 2006-25, réalisé entre février 2007 et février 2009.*



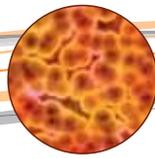
## CONFÉRENCE INVITÉE

### Écologie et évolution des maladies transmissibles. L'importance de l'approche intégrative

#### **Jean-François GUÉGAN**

*Directeur de recherche à l'Institut de recherche pour le développement (UMR MIVEGEC), Montpellier et Professeur associé à l'École des hautes études en santé publique, Rennes et Paris*

Jean-François GUEGAN est directeur de recherche à l'Institut de recherche pour le développement dans l'UMR MIVEGEC entre l'IRD, le CNRS et les universités de Montpellier 1 et 2, où il anime une équipe sur les dynamiques de propagation infectieuse. Professeur associé à l'École des hautes études en santé publique, il est responsable d'une spécialité de master international affichée Erasmus Mundus en environnement- santé / environnement au travail. Il y enseigne plus particulièrement les conséquences du changement global sur la santé des populations. Il travaille actuellement sur les changements environnementaux planétaires et en particulier, l'érosion de diversité biologique sur le risque infectieux pour l'humain. Membre sortant du Haut conseil de la santé publique où il a co-présidé plusieurs expertises collégiales sur le changement climatique et la santé, notamment, le plan national d'adaptation au changement climatique pour la partie santé et celle sur les maladies infectieuses émergentes. Ancien membre du conseil scientifique de l'Afsset, il est responsable de plus d'une centaine d'articles scientifiques internationaux et de l'édition de six ouvrages dont trois à destination de l'enseignement supérieur.



# Méthodes d'évaluation de l'exposition et de la contamination

## SESSION 2

### **Benoit COURNOYER**

Directeur de recherche, centre de ressources biologiques « Environnement microbiologie Lyon » ; DU-adjoint de l'UMR 5557 écologie microbienne

Docteur *es sciences* en écologie microbienne de l'Université Lyon 1, Benoit COURNOYER a effectué plusieurs formations en écologie microbienne au Canada dans les universités McGill à Montréal et Laval au Québec ainsi qu'un post-doctorat au Royaume-Uni en 1996. Il a intégré le CNRS. Depuis, il a été à l'origine de la création d'une équipe de recherche sur l'écologie et la génétique évolutive des bactéries pathogènes opportunistes en 2002, et en 2005 du Centre de ressources biologiques « Environnement microbiologie Lyon ». A l'heure actuelle, il est directeur de recherche au CNRS et directeur universitaire adjoint de l'UMR 5557 écologie microbienne.

### Évaluation du risque d'exposition à *Pneumocystis jirovecii* dans l'environnement hospitalier : présence, viabilité et circulation du champignon

**Anne TOTET**<sup>1</sup>, Céline DAMIANI<sup>1</sup>, Firas CHOUKRI<sup>2</sup>, Solène Le GAL<sup>3</sup>, Jean MENOTTI<sup>2</sup>, El Mouktar ALIOUAT<sup>4</sup>, Eduardo DEI CAS<sup>4</sup>, Gilles NEVEZ<sup>3</sup>, Francis DEROUIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de parasitologie et mycologie, CHU d'Amiens, EA 4285, université de Picardie Jules Verne d'Amiens ;

<sup>2</sup>Laboratoire de parasitologie et mycologie, hôpital Saint-Louis, EA 3520, université Paris Diderot, Paris ; <sup>3</sup>Laboratoire de parasitologie et mycologie, CHU de Brest, EA 3882, université de Brest ; <sup>4</sup>Laboratoire de biologie et diversité des pathogènes eucaryotes, Inserm U1019, CNRS UMR8204, Institut Pasteur, Lille

### **BIOGRAPHIE**

Anne TOTET est docteur en médecine et professeur des universités – praticien hospitalier, ses recherches concernent l'épidémiologie moléculaire des infections. Elle possède aussi une grande expérience dans la détection et la quantification moléculaire des charges fongiques dans des échantillons broncho-pulmonaires, l'analyse génomique de *Pneumocystis*, le dosage des composants de la paroi fongique dans les échantillons biologiques et échantillons d'air. Elle participe aussi à des études cliniques sur la pneumonie et sur l'acquisition et la transmission nosocomiales de *Neumocystis jirovecii*.

## RÉSUMÉ

### Introduction

Le genre *Pneumocystis* désigne des micromycètes opportunistes infectant les mammifères. En cas d'immunodépression, ils sont responsables d'une pneumonie alvéolo-interstitielle grave, la pneumonie à *Pneumocystis* (PPC). Les espèces du genre *Pneumocystis* présentent par ailleurs une spécificité pour leur hôte. *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) désigne l'espèce spécifique de l'homme et *P. carinii* désigne celle spécifique du rat. Il existe aujourd'hui de nombreux arguments en faveur de la transmission de *Pneumocystis* par voie aérienne entre deux hôtes de la même espèce mais les risques de transmission nosocomiale sont mal évalués. De plus, la nature de la contamination aérienne dans l'environnement des sujets infectés reste à déterminer. Le principal objectif de nos travaux a été l'étude de l'excrétion de *Pneumocystis* par l'hôte infecté, dans le but de clarifier la dynamique de transmission de ce champignon et d'apporter des bases scientifiques rationnelles à la prévention du risque de PPC chez l'homme.

### Méthode

Dans une première partie, nous avons optimisé la technique de recueil et de quantification de *Pneumocystis* dans l'air en associant la réalisation des prélèvements d'air par impaction sur milieu liquide à l'aide de l'impacteur *Coriolis*®  $\mu$  (Bertin technologies, France) et la quantification de *Pneumocystis* dans l'échantillon d'air par une réaction de PCR en temps réel. Cette méthode a été validée dans un modèle expérimental de PPC chez le rat *nude* infecté par *P. carinii*, l'espèce qui lui est spécifique. Dans une deuxième partie, nous avons appliqué la même procédure de prélèvement par impaction et quantification par PCR en temps réel pour détecter *P. jirovecii* dans l'air des chambres de patients hospitalisés pour PPC. Nous avons ensuite étudié la concordance des géotypes de *P. jirovecii* dans les échantillons respiratoires et l'air exhalé provenant de ces patients.

### Résultats

Les études expérimentales nous ont permis de décrire la cinétique d'excrétion de *P. carinii* dans l'air au cours de l'infection chez le rat *nude* et de mettre en évidence une corrélation entre la charge fongique dans l'air et la charge pulmonaire chez l'animal infecté.

En milieu hospitalier, les résultats montrent une importante diffusion de *P. jirovecii* dans l'environnement immédiat et à distance des patients. De plus, l'identité génotypique de *P. jirovecii* dans les échantillons respiratoires et dans l'air exhalé des patients est compatible avec l'excrétion du champignon dans l'air par les patients infectés et la transmission aérienne du champignon. Cette étape du travail a également permis de montrer que des organismes mutants, et donc potentiellement résistants, circulent en milieu hospitalier.

### Conclusion

Ces données viennent directement appuyer les recommandations d'isolement des patients infectés destinées à limiter le risque de transmission nosocomiale de la PPC. Dans la perspective d'initier une démarche d'appréciation quantitative du risque pour la PPC, nos données apportent les premiers éléments sur la quantification du danger dans l'environnement et le risque d'exposition.

*Projet 2006-41, réalisé de janvier 2007 à décembre 2008.*

# Développement et évaluation d'un micro-biocapteur pour l'immunodétection en temps réel de *Legionella pneumophila* dans les prélèvements environnementaux

**Serge RIFFARD**<sup>1</sup>, Frédéric GRUY<sup>2</sup>, Olivier PARRIAUX<sup>3</sup>, Charles CERVIN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Groupe immunité des muqueuses et agents pathogènes (GIMAP), EA 3064, IFR 143 IFRESIS, faculté de Médecine, université Jean Monnet de Saint-Etienne ; <sup>2</sup>Laboratoire des procédés en milieux granulaires, UMR CNRS 5148, IFR 143 IFRESIS, école nationale supérieure des Mines de Saint-Etienne ; <sup>3</sup>Laboratoire Hubert CURIEN, UMR CNRS 5516, université Jean Monnet Saint-Etienne ; <sup>4</sup>Microbiodetection SARL, France

## BIOGRAPHIE

Serge RIFFARD, docteur es sciences en écologie microbienne, professeur des universités habilité à diriger des recherches, est un des spécialistes français de la microbiologie environnementale et de l'immunologie. A ce titre, il a été responsable de plusieurs projets d'envergure internationale financés par des structures tel que l'American Water Works Association Research Foundation. Serge RIFFARD est membre du Groupe européen de travail sur les infections à *Legionella* (EWGLI) et a participé comme rapporteur dans des appels à projets de recherche de l'Anses.

## RÉSUMÉ

### Introduction

L'objectif était de mettre au point un outil de diagnostic rapide en temps réel permettant d'évaluer la présence de *L. pneumophila* à partir d'échantillons environnementaux d'origines variées (eau chaude sanitaire, aérosols). La base du projet reposait sur une technique d'immuno-capture (anticorps monoclonaux) où seraient dénombrés en temps réel à l'aide d'un capteur laser, les événements fixés sur une matrice à caractère innovant.

### Méthode

Le microbio-capteur se compose de trois parties. Un système fluidique étanche comprenant une chambre d'écoulement et une pompe péristaltique. Un support plan quartz gravé selon la longueur d'onde de la source lumineuse choisie recouvert d'un oxyde métallique à haut indice de réfraction. Un transducteur composé d'un guide d'onde optique comportant une source d'excitation et d'une caméra numérique haute résolution. La détection repose sur le principe de résonance par guide d'onde. Un laser argon à 488 nm va générer une onde qui arrive sur l'interface avec un angle d'incidence qui est supérieur à l'angle de réfraction limite, entraînant une réflexion totale de l'onde lumineuse. Une onde évanescente se forme tangentiellement à l'interface vide-capteur, créant un champ électromagnétique confiné au voisinage de l'interface ce qui excite uniquement le fluorochrome (SYTO-9) des bactéries préalablement marquées et fixées aux anticorps du capteur. Les bactéries émettent donc une fluorescence qui est enregistrée par une caméra CCD. Les images sont ensuite traitées par un logiciel d'analyse.

Le processus de mise au point a consisté à optimiser la fixation des anticorps spécifiques (dont nous disposons de l'exclusivité) de manière uniforme et saturante sur le support. Les études initiales de performance du capteur ont été réalisées en conditions statiques (pas de circulation d'échantillon sur le capteur). Ces études ont conduit à la validation du protocole de fixation de l'anticorps sur le capteur, à l'étude de sa stabilité et aux études préliminaires de spécificité et sensibilité (la fluorescence des bactéries est obtenue sous guide d'onde, l'étude des interactions bactéries-capteur a nécessité l'emploi d'un microscope à fluorescence dans un premier temps).

### Résultats

Le système fluïdique tel qu'imaginé est étanche (pas d'aérosolisation). Le protocole élaboré permet, du fait de l'oxyde métallique utilisé, de fixer directement et uniformément sur le support, sans ligand de type silane, l'anticorps monoclonal choisi. La nature très résistante de cet oxyde métallique permet par ailleurs la réutilisation du support. Concernant la spécificité du capteur, aucune interaction entre le support ou l'anticorps n'est détectable avec d'autres bactéries potentiellement présentes (tests en condition statique). Les études de caractérisation du capteur en microscopie confocale ne montrent pas d'orientation préférentielle des bactéries sur le capteur. Les bactéries sont détectées par le guide d'onde (émission de fluorescence) et leur quantification par microscopie à fluorescence permet d'atteindre une sensibilité de 100 % s'agissant de suspensions calibrées à 103 en *L. pneumophila*.

### Conclusion

Les études de détection en temps réel de *L. pneumophila* par guide d'onde sous système dynamique en configuration finale (grâce à une caméra CCD de 1,5 µm de résolution maximale et 9 µm de résolution minimale pour une image de 1280 X 1024, acquisition d'images et traitement par logiciel *ad hoc*) restent à faire. Le capteur (support+Ac) sera installé dans la chambre d'écoulement intégrée au système fluïdique lequel entraînera les bactéries à une vitesse optimisée pour favoriser le contact entre les anticorps et les bactéries. En fin de passage l'échantillon sera de nouveau diffusé pour s'assurer que toutes les cellules ont été fixées, ensuite un liquide neutre permettra d'éliminer les cellules déposées mais non capturées spécifiquement. Il sera nécessaire de revalider la spécificité et la sensibilité du capteur dans sa configuration finale avec des suspensions calibrées puis avec des échantillons réels (en particulier d'aérosols s'agissant de mesurer le risque ou l'exposition à *L. pneumophila*). Par ailleurs, le mécanisme de fixation spontanée de l'anticorps sur le support devra être investigué et des études en microscopie à force atomique (déjà en cours) permettront de mieux caractériser le capteur (saturation en anticorps notamment). Cette technologie est très fortement susceptible d'être valorisée.

*Projet 2008-34, réalisé de janvier 2008 à juin 2009.*

## Émergence des toxines marines : vigilance et évolution de la caractérisation du danger. Cas d'Ostreopsis et des palytoxines en Méditerranée

**Sophie KRYS**<sup>1</sup>, Sophie TROTÉREAU<sup>1</sup>, Rodolphe LEMÉE<sup>2</sup>, Ronel BIRÉ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Anses - Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort ; <sup>2</sup>Laboratoire d'océanographie de Villefranche, CNRS UMR 7093, université Pierre et Marie Curie, Villefranche-sur-Mer

### BIOGRAPHIE

Sophie KRYS, doctorat en spectrochimie, analyse organique et biologique, est chef de l'unité caractérisation des toxines du Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort de l'Anses. Elle a en charge l'élaboration des projets de recherche et de leur réalisation ainsi que du pilotage de l'unité.

## RÉSUMÉ

### Introduction

Les phycotoxines, métabolites secondaires de micro algues marines, présentent une grande diversité structurale et biologique. Si la présence de certaines familles sur les côtes européennes est bien connue, ces dernières années ont été marquées par l'apparition d'épisodes toxiques non expliqués ou liés à de nouvelles familles de toxines. La nécessité de détecter de possibles émergences a entraîné la mise en place d'un dispositif de vigilance au niveau national. Celui-ci s'accompagne du développement de nouvelles approches pour caractériser le risque lié à ces toxines parfois non connues. Le cas du développement depuis 2006 d'*Ostreopsis cf ovata* et des palytoxines en Méditerranée française sera présenté pour illustrer l'étude des impacts sanitaires d'origines environnementales et alimentaires. Seront détaillés les résultats d'un projet visant à produire les 1<sup>res</sup> données nationales et d'étudier à la fois l'efflorescence d'*Ostreopsis* et la contamination des produits de la mer entrant dans l'alimentation.

### Méthode

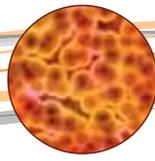
Quatre sites ont été échantillonnés en 2009 et 1 en 2010. Les abondances en cellules phytoplanctoniques et benthiques ont été déterminées selon la méthode d'Utermöhl. Les niveaux de contamination des produits de la pêche ont été déterminés d'une part à l'aide d'un test *in vitro* de screening et, d'autre part, pour les échantillons contaminés, selon une méthode développée au laboratoire par LC-MS/MS.

### Résultats

La corrélation est bonne entre les abondances en *Ostreopsis* et les niveaux de contamination en palytoxines dans les produits de la mer. Des espèces herbivores comme des espèces carnivores ont présenté des contaminations, cependant le niveau en toxines est généralement plus élevé dans les 1<sup>res</sup> espèces. Lors de ces épisodes, la contamination a uniquement été retrouvée dans les tissus digestifs des organismes, à une exception près. L'ovatoxine A est l'analogue majoritaire (90 %).

### Conclusion

Ce type de données doit être complété et est essentiel pour affiner l'évaluation des risques alimentaires menée par l'Efsa en 2009 dans la mesure où celle-ci portait uniquement sur les mollusques bivalves. Il apparaît également nécessaire de pouvoir disposer de données toxicologiques pour les différents analogues de la palytoxine, en particulier de l'ovatoxine A vu sa présence en quantité significative sur les côtes françaises.



# Écologie et maîtrise de la résistance aux antibiotiques

SESSION 3

### **Pascal SANDERS**

*Anses - Directeur du Laboratoire de Fougères*

Docteur vétérinaire et docteur de l'Institut national polytechnique de Toulouse, les activités scientifiques de Pascal SANDERS ont principalement porté sur l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire, de la détermination de posologie efficace à l'étude et le contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires et le développement de la résistance aux antibiotiques chez les animaux et les risques associés pour la santé animale et la santé humaine. Il dirige actuellement le laboratoire de Fougères de l'Anses, laboratoire national de référence pour les résidus de médicaments vétérinaires, laboratoire de référence de l'Union européenne pour les résidus d'antibiotiques et laboratoire national de référence pour la résistance aux antibiotiques.

## INTERVENANTS

### Ecologie de la résistance aux antibiotiques de *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans les flores commensales de l'homme et des animaux en milieu naturel

#### **Antoine ANDREMONT**

*EA 3964, faculté de médecine Paris Diderot, groupe hospitalier Bichat-Claude Bernard de Paris*

#### **BIOGRAPHIE**

Antoine ANDREMONT, après une formation clinique de base en pédiatrie, complétée par une formation à la recherche aux Etats-Unis et un séjour en milieu tropical, a opté pour la bactériologie médicale. Depuis 1996, il dirige le laboratoire de bactériologie du groupe hospitalier Bichat-Claude Bernard, CHU à forte composante infectieuse, chirurgicale et cardiologique. Sur le plan universitaire, il est professeur des universités.

Aujourd'hui, ses activités scientifiques intègrent les composantes hospitalières, universitaires et de recherche centrées sur le rôle des flores commensales dans l'évolution de la résistance bactérienne et les moyens de la combattre.

## RÉSUMÉ

### Introduction

La dissémination des gènes de résistance des bactéries aux antibiotiques pose des problèmes majeurs en santé publique du fait de la raréfaction des nouveaux antibiotiques. Cependant les conditions épidémiologiques et écologiques qui la sous-tendent sont encore mal étudiées.

Le projet ERAES vise à déterminer les conditions de dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques autour d'une source de pression de sélection unique. Il tire avantage pour sa réalisation de l'existence dans le sud de la Guyane d'un village amérindien isolé au sein d'une zone d'accès restreint et où la seule dispensation d'antibiotiques est assurée par un dispensaire dont toutes les prescriptions sont enregistrées et les soins gratuits pour les amérindiens du village.

### Méthode

A quatre reprises (2000, 2006, 2008, 2010) nous avons effectué chez les villageois volontaires des prélèvements de flore commensale (nez, selles) pour y étudier la résistance de bactéries cibles et leur évolution au cours du temps. Lors de la dernière campagne les prélèvements de selles ont été conditionnés de façon à pouvoir mettre en œuvre des techniques métagénomiques et métatranscriptomiques. L'ADN des villageois a également été prélevé pour recherche des facteurs spécifiques de l'hôte. Par ailleurs, des selles de rongeurs domestiques et sauvages ont été récupérées après piégeage à des distances variant de 0 à 3000 m du village le long d'un transept en forêt primaire non anthropisée. Enfin, des prélèvements de sol et de la rivière qui baigne le village ont été réalisés en 2010 pour y étudier la dissémination des gènes de résistance dans l'environnement. Un consortium multidisciplinaire étudie ces prélèvements dont les résultats sont concentrés dans une base de données.

### Résultats

A ce jour, les principaux résultats sont les suivants : nous avons d'abord montré par l'étude de la flore intestinale des villageois que ce qui se passait dans cette petite communauté modélisait l'évolution de la résistance dans les communautés moins isolées et plus ouvertes. L'analyse des relations entre consommation d'antibiotique au niveau populationnel est particulièrement intéressante. Comme attendu son augmentation entraîne une augmentation de la résistance mais sa baisse, dont l'effet était mal connu, montre une diminution de la diffusion de gènes de résistance (de type BLSE) qui sont particulièrement important en santé publique actuellement. Ceci est une incitation forte à poursuivre et amplifier les politiques de restriction de la consommation des antibiotiques. Nous avons ensuite montré au niveau de la flore nasale que les classifications actuelles des sujets en termes de portage permanent de staphylocoques ne correspondaient pas à la réalité sur le long terme. Le brassage des populations bactériennes est beaucoup plus intense que prévu et nous avons pu décrire en détails la circulation de certains gènes. En outre nous avons confirmé que certains traits génétiques de l'hôte étaient significativement associés au portage de nasal de staphylocoques.

En ce qui concerne la dissémination des gènes de résistance au-delà des bactéries des populations humaines, nos premiers résultats indiquent que la dissémination vers les populations animales est plus limitée dans l'espace que cru auparavant, les transmissions secondaires entre espèces animales semblant peu efficaces.

L'analyse des prélèvements aqueux et telluriques et les analyses métagénomiques des prélèvements attendent qu'un financement dédié soit disponible.

### Conclusion

Les résultats déjà engrangés sont riches. Ils ont donné lieu à 5 publications de bon FI (2.38 = 1 ; 5.54 = 1 ; 5.87 = 2 ; 6.78 = 1) et améliorent notre compréhension de la dissémination des gènes de résistance. Il semble souhaitable que des financements complémentaires soient débloqués pour que l'analyse des multiples prélèvements encore stockés puisse être menée dans les termes proposés lors de la présentation du projet.

*Projet 2005-01 et projet 2009-21 en cours de réalisation.*

## Maitrise de la dispersion des gènes de résistance aux antibiotiques en milieux naturels

**Pascal SIMONET**<sup>1</sup>, Dominique SCHNEIDER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Equipe génomique microbienne environnementale, unité mixte de recherche 5005, laboratoire Ampère, école centrale de Lyon ; <sup>2</sup>Laboratoire adaptation et pathogénie des microorganismes, institut Jean Roget, facultés médecine/pharmacie

### BIOGRAPHIE

Pascal SIMONET, microbiologiste de formation, s'est spécialisé dans l'écologie microbienne et la métagénomique. Aujourd'hui, il est directeur de recherche au CNRS, responsable d'équipe. Ses travaux de recherche actuels concernent, notamment, l'impact des plantes transgéniques sur la microflore du sol, l'importance du transfert de gènes dans l'adaptation bactérienne et l'inventaire taxonomique et fonctionnel de la microflore tellurique en utilisant l'approche métagénomique avec un focus sur les gènes de résistance à des antibiotiques.

### RÉSUMÉ

#### Introduction

Prévalence naturelle des gènes de résistance à des antibiotiques et impact de situations anthropiques. Notre étude s'est focalisée sur 3 types d'environnements, un environnement contrôle représenté par des échantillons prélevés sur un sol d'une prairie pâturée par des bovins non traités aux antibiotiques et deux environnements possiblement à risques : des sols sur le territoire des USA à proximité d'une ferme faisant abondamment usage des antibiotiques pour l'élevage des animaux (porcs), et des parcelles d'une station expérimentale cultivant des plants de maïs conventionnels et OGM (événement Bt-176). Les travaux ont été réalisés par une approche métagénomique, les objectifs étant d'isoler des clones recombinants *Escherichia coli* exprimant la résistance recherchée, afin d'en étudier le gène et son environnement génomique, pour établir son potentiel de transférabilité. Notre objectif a été ainsi de caractériser la dynamique des mécanismes évolutifs et moléculaires impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones chez *Legionella pneumophila*. Pour ce faire, nous avons développé une stratégie d'évolution expérimentale, qui permet de propager des bactéries dans des conditions définies et surtout de conserver l'ancêtre et intermédiaires évolutifs, puis de pouvoir les comparer.

#### Méthode

Nos travaux ont consisté à créer une banque d'ADN métagénomique riche de 80 000 clones comprenant des inserts d'ADN métagénomique de 40 kb et de mettre en place les protocoles pour cribler la totalité des clones de cette banque par hybridation sur membranes avec des sondes constituées de gènes de résistance connus : gène *bla* (résistance à l'ampicilline), gène *aadA* (résistance à la streptomycine et à la spectinomycine) et gène *ermB* (résistance à l'érythromycine). En parallèle et en vue de valider cette approche de criblage de la banque métagénomique par hybridation, l'ADN bactérien total extrait du sol (ayant servi à constituer la banque) a été directement séquencé (pyroséquençage). Notre étude s'est intéressée à un deuxième environnement afin d'évaluer spécifiquement l'impact des cultures OGM sur la microflore tellurique résistante à des antibiotiques. Les travaux ont été réalisés à partir d'échantillons de sol prélevés dans une parcelle expérimentale de la station Inter Institut AGPM-technique de Baziège (Haute-Garonne). Au moment des prélèvements, la parcelle avait été cultivée avec le maïs transgénique Bt-176 pendant dix années consécutives, condition potentiellement favorable à un transfert de gènes vers les bactéries, étant donnée l'accumulation progressive d'ADN de la plante dans le sol.

Concernant la dynamique des mécanismes évolutifs et moléculaires impliqués dans la résistance à des antibiotiques huit lignées indépendantes d'évolution expérimentale ont été initiées à partir d'un ancêtre commun de *L. pneumophila* et propagées par des transferts sériques dans un milieu contenant des doses croissantes de moxifloxacin. Notre étude s'est intéressée à un deuxième environnement afin d'évaluer spécifiquement l'impact des cultures OGM sur la microflore tellurique résistante à des antibiotiques. Les travaux ont été réalisés à partir d'échantillons de sol prélevés dans une parcelle expérimentale de la station Inter Institut AGPM-technique de Baziège (Haute-Garonne). Au moment des prélèvements, la parcelle avait été cultivée avec le maïs transgénique Bt-176 pendant dix années consécutives, condition potentiellement favorable à un transfert de gènes vers les bactéries, étant donnée l'accumulation progressive d'ADN de la plante dans le sol. Concernant la dynamique des mécanismes évolutifs et moléculaires impliqués dans la résistance à des antibiotiques huit lignées indépendantes d'évolution expérimentale ont été initiées à partir d'un ancêtre commun de *L. pneumophila* et propagées par des transferts sériques dans un milieu contenant des doses croissantes de moxifloxacin.

### Résultats

Pour le premier sol (témoin), les résultats ont révélé la présence de gènes de résistance à des antibiotiques à des fréquences très différentes dans le génome des bactéries du sol (forte représentation des gènes *bla*, beaucoup plus faible pour le gène *ermB* et très faible pour le gène *aadA*), donnant ainsi les premières indications sur ce que peut être l'état de référence d'un sol en l'absence d'une pression anthropique de type culture OGM ou élevage d'animaux traités aux antibactériens (Demanèche et al., 2009). Pour le sol sur lequel ont été cultivés des maïs transgéniques Bt-176 nos travaux ont permis de montrer que le gène *bla* du transgène est naturellement présent dans les sols avec ou sans plantes transgéniques. La culture de ce maïs transgénique n'a eu aucun effet sur le niveau de résistance des bactéries aux antibiotiques de la famille des bêta-lactames, ces dernières possédant naturellement une très grande capacité de résistance. De plus, l'utilisation d'outils moléculaires de très grande sensibilité comme les puces à ADN n'a révélé aucun changement significatif de la communauté bactérienne du sol lié à la culture pendant dix années consécutives de ces plantes transgéniques (Demanèche et al., 2008). Dans le cadre des travaux sur la dynamique des mécanismes évolutifs et moléculaires les résultats montrent que les bactéries se sont adaptées à cet environnement, de façon reproductible au sein des huit lignées. En effet, l'adaptation s'est manifestée par des accroissements parallèles progressifs de la CMI de moxifloxacin jusqu'à 512 fois la CMI de la souche ancestrale. En isolant et caractérisant des clones évolués au dernier temps évolutif, nous avons pu identifier la totalité des mutations substituées qui confèrent l'accroissement de la résistance à la moxifloxacin. Ces mutations affectent les gènes codant les topoisomérases de type II, notamment les gènes *gyrA*, *gyrB*, et *parC* codant les deux sous-unités de l'ADN gyrase et une sous-unité de la topoisomérase IV, respectivement. Ceci reflète un haut niveau de parallélisme génétique entre les différentes lignées indépendantes. De plus, en isolant des clones évolués à différents temps évolutifs, nous avons déterminé l'ordre de substitution des mutations conduisant à l'augmentation progressive de la concentration minimale inhibitrice (CMI) au cours de l'évolution. Pendant l'évolution, le changement T83I dans *GyrA* s'est produit en premier, suivi de G78D ou S80R dans *ParC*, et D87N dans *GyrA* ou S464Y ou D426N dans *GyrB*.

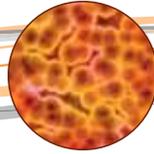
Afin de démontrer l'implication directe de ces mutations dans l'accroissement de résistance, nous avons construit des souches isogéniques, en introduisant par recombinaison homologe chaque mutation, seule ou en combinaison, dans le chromosome de la souche ancêtre sensible à la moxifloxacin. Nous avons alors mesuré les CMIs pour la moxifloxacin de ces différentes souches isogéniques, excepté pour les mutations des gènes de topoisomérase.

Nous avons alors mesuré les CMI pour la moxifloxacine de ces différentes souches isogéniques, excepté pour les mutations des gènes de topoisomérase. Nous avons montré que l'accroissement progressif de la résistance était non seulement lié à ces mutations, mais aussi à un ordre bien défini de substitution des mutations. Tout changement de ces processus évolutifs en influant sur cet ordre ne conduit plus à des niveaux élevés de résistance.

### Conclusions

Des trajectoires mutationnelles spécifiques ont ainsi été mises en évidence, suggérant fortement que des interactions épistatiques intermoléculaires entre les topoisomérases sont responsables des mécanismes de résistance chez *L. pneumophila*. Nos résultats suggèrent que *L. pneumophila* peut devenir très facilement résistante aux fluoroquinolones, et démontrent la nécessité de développer des outils d'investigation de la résistance dans les souches cliniques et environnementales de ce pathogène émergent. En utilisant nos résultats, nous développons un outil de détection des mutations de résistance par une approche de PCR quantitative en temps réel. L'objectif est d'analyser la présence de souches de *Legionella* résistantes aux antibiotiques dans l'environnement et chez les patients. En effet, des échecs thérapeutiques ont été mis en évidence suite à des infections par *Legionella*.

*Projet 2006-44, réalisé de décembre 2006 à décembre 2008.*



# Posters

*Poster non communiqué:*

**Outil d'évaluation de procédés d'élimination des légionelles  
dans les réseaux**

Jacques FRERE, université de Poitiers (projet 2007-01)

## Caractérisation et mode d'action de la warnéricine RK, un peptide anti-*Legionella*

Julien VERDON, Jean-Marc BERJEAUD et Yann HÉCHARD  
Projet 2005-5 : de janvier 2006 à janvier 2009

### Contexte et objectifs

Les traitements classiques contre *Legionella* ne permettent pas d'éliminer complètement cette bactérie dans les systèmes contaminés. Il est donc intéressant de rechercher de nouvelles molécules actives contre *Legionella*.

Notre équipe avait isolé, à partir d'un *Staphylococcus warneri*, un peptide antimicrobien particulier, la warnéricine RK (WRK). Ce peptide possède une activité spécifique contre les bactéries du genre *Legionella* (Hécharde et al. 2005). Il est le seul peptide antimicrobien spécifique de *Legionella* décrit dans la littérature.

Nous avons fait l'hypothèse que cette spécificité devait dépendre d'une ou plusieurs molécules, caractéristiques de *Legionella*.

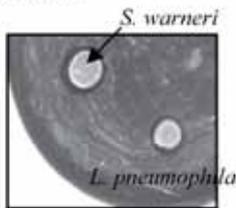


Figure 1. Test activité anti-*Legionella* sur gélose

**Objectif : recherche de la cible et compréhension du mode d'action de ce peptide**

### Structure et Activité

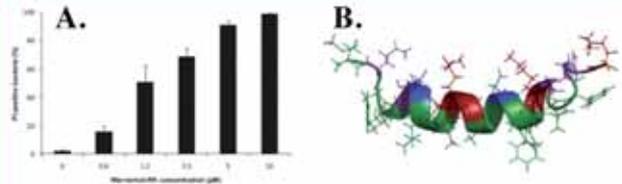


Figure 3. Activité contre *Legionella* mesurée par cytométrie en flux (A) et structure RMN de la WRK (B). (Verdon et al., 2009, Biophys J)

- Activité bactéricide dose dépendante (Figure 3A).
- Structure en hélice  $\alpha$  amphiphile (Figure 3B).

### Mode d'action

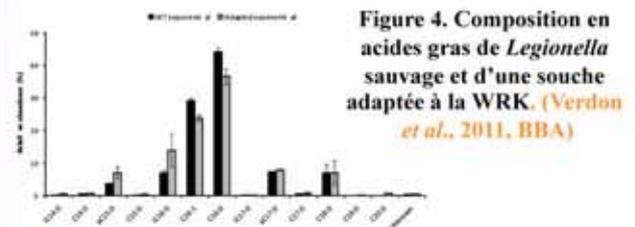


Figure 4. Composition en acides gras de *Legionella* sauvage et d'une souche adaptée à la WRK. (Verdon et al., 2011, BBA)

- Sélection d'une souche adaptée à la WRK
- Modification des acides gras au niveau des C16 (Figure 4).

### Purification de la warnéricine RK

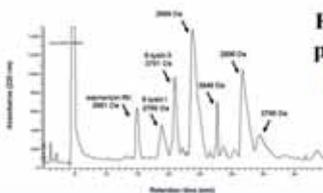


Figure 2. Purification (HPLC) à partir du surnageant de culture. (Verdon et al., 2008, Peptides)

- Plusieurs peptides anti-*Legionella* sont produits par cette bactérie (Figure 2).

### Conclusion

- La WRK a pour cible la membrane de *Legionella*
- Aucune souche résistante n'a pu être sélectionnée, soulignant l'intérêt de ce peptide.
- La souche adaptée a une composition en acides gras différente de la souche sauvage et certains gènes impliqués dans ce métabolisme sont réprimés.
- Il reste à déterminer quelle caractéristique de la membrane la rend plus sensible à la warnéricine RK.

### Retombées en Santé environnement

- Caractérisation de molécules spécifiquement anti-*Legionella*
- Caractérisation de cibles potentielles pour traitement anti-*Legionella*



Contact du projet : Yann, HÉCHARD  
Laboratoire Chimie et Microbiologie de l'Eau, UMR CNRS 6008, Univ. Poitiers  
Tél : 0549454007 – Fax : 0549454007 – yann.hechard@univ-poitiers.fr  
Partenaires du projet : Carmen Buchrieser, Institut Pasteur



## MODELISATION NUMERIQUE DE LA DISPERSION DE MICROORGANISMES EN ENVIRONNEMENT PERIURBAIN

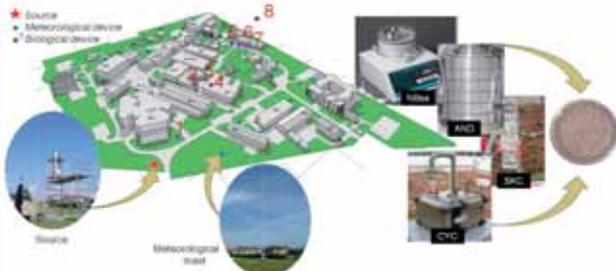
ERIC TARNAUD<sup>1</sup>, FRÉDÉRIC TOGNET<sup>1</sup>, CYRILLE TURMEAU<sup>2</sup>, TI L. HA<sup>3</sup>, LAURENCE ROUIL<sup>1</sup>, ENRIC ROBINE<sup>3</sup>, YANNICK MOREL<sup>2</sup>  
 Projet 2007-53 : date de début : décembre 2007 - date de fin : mars 2010

### Contexte et objectifs

L'objectif de cette étude soutenue par l'Anses a été d'évaluer la capacité à estimer la diffusion potentielle de microorganismes par une source anthropique de type TAR, en confrontant les données issues de la simulation (modélisation) à des mesures expérimentales (échantillonnages terrain). Les limites des modèles numériques ainsi que celles des différents types d'instruments ont pu être évaluées.

### Dispositif expérimental /Disposition

Les expérimentations *in situ* ont consisté en 3 dispersions de spores de *Bacillus atrophaeus* (BGs) sur un site périurbain. Des prélèvements d'air ont été réalisés à des distances de 50, 100, 200 et 300 m de la source d'émission.



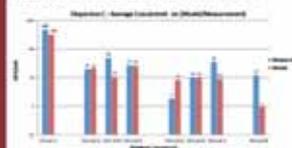
Les concentrations moyennes en agent traceur et la granulométrie des particules ont été déterminées à l'aide de biocollecteurs de type impacteur sur gélose (Andersen 6 étages) ou en milieu liquide (cyclone à paroi humide Soprano, Biosampler SKC). En parallèle, des impacteurs sur gélose tournante (Slit sampler New Brunswick) ont permis de suivre les variations temporelles des concentrations.

### Approche modélisation

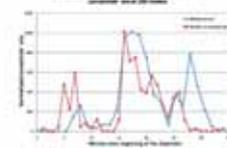
- Modèle 3D lagrangien MSS (Micro Swift Spray, Aria Technologies)
- Avec module « obstacles » + Module panache humide + module biologique
- Reconstruction des champs de vent stationnaires sur 1 min
- A l'aide des données météorologiques expérimentales
- Agent traceur sans perte de viabilité et initialement contenu dans des gouttelettes.
- Spectre granulométrique des gouttelettes prédéterminé

### Résultats

Le rapport des valeurs des concentrations maximales (mesures/modèle) se situe dans une fourchette de 4 à 12, ce qui montre que l'approche numérique n'est pas aberrante compte tenu des incertitudes sur la mesure.



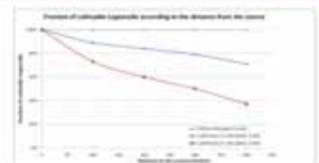
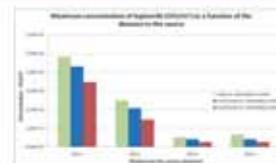
Séries temporelle des C<sub>a</sub> air normalisées (NBs vs code MSS)



Durée du passage du nuage bactérien OK  
 Amplitudes des fluctuations OK

### Modélisation de la dispersion à partir d'une TAR

A partir des paramètres physiques de la TAR et des données météorologiques mesurées lors de la troisième dispersion, nous avons simulé une dispersion de la tour en plaçant à la source étudiée précédemment et en utilisant le module biologique qui décrit les conditions de cultivabilité de *Legionella* (T.L. Ha 2005).



Les résultats montrent que l'application du modèle biologique conduit à une cultivabilité de 40% à 400 m de la source (concentration initiale de 10<sup>5</sup> UFC / L (concentration maximale autorisée dans l'eau d'une TAR). Les valeurs de concentration obtenues après modélisation sont très faibles et montrent que la contamination par des bactéries isolées semble peu probable étant donné les caractéristiques de la TAR étudiée et la concentration initiale utilisée.

### Conclusion

Les résultats obtenus lors de ces campagnes de mesures des bioaérosols atmosphériques ont permis de voir que la modélisation était pertinente pour décrire les phénomènes mis en jeu. On obtient des concentrations du même ordre pour la modélisation et les échantillonneurs compte tenu des incertitudes sur les mesures et de celles inhérentes à la modélisation.

INERIS

Contact du projet: Eric TARNAUD  
[eric.tarnaud@ineris.fr](mailto:eric.tarnaud@ineris.fr); tel : 03.44.55.64.13

CSTB  
 le futur en construction

DGA

1 Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), 60550 Verneuil en Halatte, France.  
 2 Direction Générale de l'Armement, DGA maîtrise NRBC, 91710 Vert-le-Petit, France.  
 3 Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB), 77447 Marne La Vallée, France.

## Impact de l'exposition antibiotique sur la sélection des CA-MRSA en milieu hospitalier

LAURA TEMIME.  
2009

Projet 2005-28 : de février 2006 à décembre

### Introduction

Depuis une dizaine d'années, de nouvelles souches de staphylocoques dorés résistantes à la méthicilline (CA-MRSA) sont apparues en communauté. Les CA-MRSA restent sensibles à plusieurs antibiotiques, mais leur potentiel épidémique et de virulence est supérieur à celui des souches nosocomiales.

Des données récentes suggèrent que les CA-MRSA sont de plus en plus répandues à l'hôpital, où la pression antibiotique importante pourrait conduire à la sélection de nouvelles résistances.

#### Objectifs de l'étude :

- Déterminer si les stratégies de prescription antibiotique peuvent favoriser la sélection des CA-MRSA à l'hôpital
  - Eclairer les différences épidémiologiques observées entre pays
  - Etudier l'impact d'évolutions futures dans la sensibilité des CA-MRSA aux antibiotiques
- ⇒ utilisation d'un modèle individu-centré de la transmission des staphylocoques dorés à l'hôpital

### Méthodes

#### Modèle

- Modèle individu-centré de la transmission des staphylocoques dorés dans un service hospitalier : NosoSim
- Trois souches en compétition : MSSA, HA- et CA-MRSA
- Transmission par contact direct entre patients et soignants

#### Exposition antibiotique

- Classification en 4 groupes (A, B, C, D) en fonction de la sensibilité des souches de staphylocoques :

|         | Sensibilité des Staphylocoques dorés |                      |                      |                     |
|---------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
|         | A<br>ex.ampicilline                  | B<br>ex.methicilline | C<br>ex.clindamycine | D<br>ex.vancomycine |
| MSSA    | -                                    | +                    | +                    | +                   |
| CA-MRSA | -                                    | -                    | +                    | +                   |
| HA-MRSA | -                                    | -                    | -                    | +                   |

### Simulations

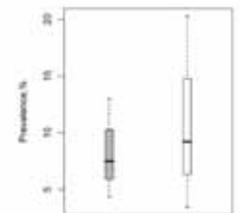
- Service de réanimation ou de médecine générale
  - Introduction initiale d'un patient colonisé à CA-MRSA et suivi pendant 30 jours de la diffusion de cette souche
  - Estimation de la prévalence à 30 jours (endémique) de portage de CA-MRSA chez les patients du service
  - 252 scénarios d'exposition antibiotique : part des groupes A, B, C et D variant entre 5 et 80% du total (100%)
- ⇒ Identification des scénarios les plus représentatifs de la situation dans 5 pays européens et aux USA

### Résultats

#### Impact des antibiotiques prescrits

La stratégie d'exposition antibiotique a un impact fort sur la sélection des CA-MRSA en milieu hospitalier. En réanimation, la prévalence des CA-MRSA varie entre 3% et 20% en fonction du scénario d'utilisation des antibiotiques (à niveau constant d'exposition totale).

La dissémination des CA-MRSA à l'hôpital est favorisée par une forte utilisation des antibiotiques du groupe B et une faible utilisation des antibiotiques des groupes C et D :



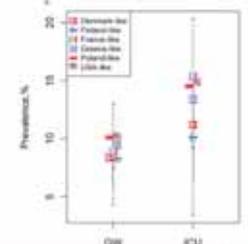
Variation de la prévalence (min, max, 25<sup>ème</sup>, 50<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentiles) de la colonisation à CA-MRSA en fonction des scénarios de prescription antibiotique : médecine générale (gauche) et réanimation (droite).

Prévalence endémique de CA-MRSA prédite en fonction du niveau relatif d'exposition aux antibiotiques des groupes B et C (la part prise par le groupe A étant fixée à 10, 30, 50 ou 80%).



#### Application

Les scénarios polonais, français et américains, dans lesquels la part du groupe B est importante, ont tendance à favoriser la diffusion des CA-MRSA ; le scénario finlandais, avec une forte consommation d'antibiotiques du groupe D, limite cette diffusion.



### Conclusion et Références

Parce qu'il s'agit d'une souche très répandue en communauté, le contrôle de la diffusion des CA-MRSA à l'hôpital représente un challenge. Cette étude montre que la stratégie de prescription antibiotique pourrait participer à ce contrôle.

Kardas-Sloma et al, AAC, 2011, 55(10) - Pour en savoir plus sur le modèle NosoSim : Temime et al, Proc Comp Science, 2010, 1(1)

le cnam

Contact du projet : Laura TEMIME

Tel : 01 53 01 80 11 – Email : laura.temime@cnam.fr

Partenaires du projet : Conservatoire national des Arts et Métiers (Cnam),  
Inserm

Inserm

## Gestions biologique et sociale de la dispersion des résistances aux antibiotiques

PASCAL SIMONET.

Projet 2007-1 : de décembre 2007 à décembre 2009

### Contexte et objectifs

L'apport des **antibiotiques** dans la lutte contre les maladies infectieuses constitue une découverte fondamentale du XXème siècle mais l'**acquisition de multi-résistances** par les pathogènes de l'Homme modifie ce rapport de force. Le sol est reconnu comme le berceau de l'**émergence des mécanismes de résistance** et le lieu de leur **dispersion** y compris vers des pathogènes humains. Dans ce contexte, notre projet propose une approche **interdisciplinaire entre sciences biologiques, humaines et sociales** pour comprendre l'impact des différents facteurs influant sur l'**émergence et la dissémination des gènes de résistance** afin de répondre aux interrogations suivantes :

- **Quel est le rôle des amibes**, prédateurs de bactéries, dans la **dissémination des résistances** à des antibiotiques ?
- **Quels sont les gènes de résistance isolés du sol** ?
- **Quels sont les contextes médiatiques et institutionnels** dans lesquels se développent des recherches portant sur des sujets socialement vifs ?

Afin de répondre à ces questions, trois sols ont été sélectionnés en raison de leur exposition différente aux antibiotiques : **Sparrows Point, Baziège, et Montrond** (Tableau 1). Trois approches ont été utilisées pour chaque sol : 1) **identification des amibes présentes et analyse de leur potentiel d'incubateur** pour les transferts de gènes de résistance ; 2) **caractérisation des gènes de résistance** par métagénomique ; 3) **analyse du contexte médiatique et des pratiques de communication** dans la recherche.

| Lieu           | Nature  | Espèces   |
|----------------|---|---|
| Montrond       | Prairie herbeuse (pâturage)                                       | • Dictyostelium mucoroides  |
| Sparrows point | « Sandy », Terrain d'épandage de lisier de porcherie industrielle | • Polysphondylium pallidum  |
| Sparrows point | « natif », Terrain contrôlé (pas d'épandage)                      | • Polysphondylium pallidum<br>• Polysphondylium violaceum   |
| Baziège        | Culture de maïs transgénique                                      | • Dictyostelium aureo-stipes<br>• Dictyostelium giganteum<br>• Dictyostelium mucoroides<br>• Dictyostelium sp. (20 %) |
| Baziège        | Culture de maïs conventionnel                                     | • Dictyostelium mucoroides<br>• Dictyostelium sp.   |

Tableau 1 - Caractéristiques des sols étudiés et composition en amibes.

### Retombées en Santé environnement

Le sol contient différents organismes avec des interactions complexes. Nous avons montré la présence de déterminants de résistance aux antibiotiques dont la dissémination pourrait dépendre des interactions entre ces différents organismes. La recherche menée montre également que les enjeux de communication sont très importants, dans les pratiques de recherche mais que les discours médiatiques à propos des relations entre OGM et résistances aux antibiotiques sont centrés quant à eux beaucoup plus sur les prises de position politiques que sur le fonctionnement de la recherche à proprement parler.

### Identification d'amibes dans le sol

Chaque sol a été étalé sur milieu nutritif avec *E. coli* comme nutriments. Des amibes, différant par la taille et le patron de ramification des fructifications, ont été détectées dans chacun des sols et identifiées (Tableau 1 et Fig. 1).

Mise au point d'un système expérimental : étude du transfert horizontal d'un plasmide lors d'une co-infection d'amibes avec *E. coli* et *Legionella pneumophila*. Aucun transfert horizontal n'a été détecté.



Figure 1 - Fructification mature de *P. pallidum* isolée de Sparrow Points "sandy".

### Caractérisation des résistances

L'ADN métagénomique est extrait des sols et inséré (~40Kb) dans un fosmide afin de générer des banques métagénomiques dans *E. coli* (Fig. 2). Après sélection sur milieux avec antibiotiques, les inserts des clones positifs sont séquencés afin d'identifier les gènes de résistance.

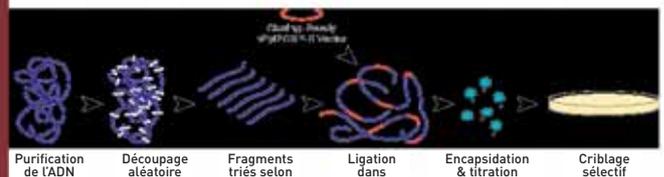


Figure 2 - Principe de la génération d'une banque d'ADN métagénomique.

### Médiatisation et communication

La communication a été étudiée sous deux angles : les formes de la médiatisation des résistances aux antibiotiques dans la presse quotidienne nationale, et les pratiques de communication quotidienne dans les équipes de recherche impliquées. La communication n'est pas uniquement une production extérieure au laboratoire (qui viendrait après la recherche, pour la valoriser, ou comme un commentaire médiatique). On constate les différentes modalités de sa présence dans les pratiques de recherche, et la manière dont elle contribue à la construction des connaissances. Dans la presse, le traitement du thème des résistances aux antibiotiques dépend des positionnements politiques des quotidiens, avec des convergences qui dépassent les clivages droite/gauche. On constate aussi des cadrages du problème différents entre la presse et certains acteurs du web : ceci montre l'hétérogénéité du champ de la presse face aux problèmes scientifiques, et le fait que certains cadrages politiques légitimes et argumentés ne sont pas représentés dans la presse, et sont alors portés par des sites web (syndicaux, altermondialistes, etc.). Les chercheurs impliqués quotidiennement sont d'ailleurs rarement sollicités par les médias, en dépit d'une intense activité communicationnelle de certains, en interaction permanente avec un réseau élargi et constamment entretenu et activé. La communication mobilise à la fois des sociabilités de longue durée, héritées et transmises, et une réactivité constante à de nouvelles sollicitations adressées à la recherche.

Contact du projet : Pascal Simonet

Tél : 04 72 18 60 92 – Fax : 04 78 43 37 17 – Email : pascal.simonet@ec-lyon.fr

Partenaires du projet : Michel Satre, Gérard Klein et Laurence Aubry (CEA Grenoble)

Joëlle Le Marec et Igor Babou (ENS Lyon),

Dominique Schneider (LAPM, UJF-CNRS, Grenoble)



## Elaboration d'outils d'évaluation qualitative et quantitative des expositions des personnels de soins aux agents biologiques à transmission aérienne

JF GEHANNO, A. LOUVEL, N. FRÉBOURG, M. PESTEL CARON, M. NOUVELLON, L. LEMÉE

Projet 2006-59 : de décembre 2006 à décembre 2008

### Contexte

L'évaluation des risques biologiques pour les agents transmissibles par voie aérienne en milieu de soin se heurte à la faiblesse actuelle des techniques de quantification des expositions. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'intérêt de deux dispositifs de prélèvement : un impacteur mono-étage déjà utilisé dans les services d'hygiène hospitalière et un impingeur.

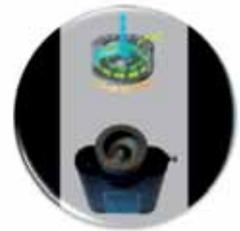
### Matériel et méthode

- Dans une première phase, des prélèvements d'air ont été réalisés dans 24 chambres de patients infectés ou colonisés par staphylocoque aureus résistant à la méthiciline (SAMR) à l'aide d'un impacteur mono-étage (MAS-100), à distance de 0,5m, 1m et 3m du patient.
- Dans une deuxième phase, 4 chambres de patients porteur de *Neisseria meningitidis* (n=1), *Bordetella pertussis* (n=2) ou *Mycobacterium tuberculosis* (n=1) ont été étudiées avec des impingeurs portables (CIP 10M). Deux impingeurs étaient placés dans la chambre du patient et 3 étaient portés par les soignants. Les analyses bactériologiques ont été réalisées par PCR spécifique sur le liquide de collecte de l'impingeur (éthylène glycol).
- Dans une dernière phase, les deux types de prélèvement ont été appliqués conjointement dans 8 chambres de patients infectés par des SAMR.

### Résultats



- Des souches de SARM ont été isolées dans 21 des 24 chambres de la première phase, dans des quantités variant de 1 à 78 cfu/m<sup>3</sup>. Dans chacune de ces 21 chambres, au moins une des souches isolées dans l'air était identique à la souche isolée chez le patient source. Il n'y avait pas d'effet de la distance entre le patient et l'impacteur.
- Les prélèvements personnels et fixes réalisés avec le CIP 10M ont tous donné des résultats négatifs pour *N. meningitidis*, *B. Pertussis* et *M. tuberculosis*.
- Dans les 8 chambres dans lesquels des prélèvements ont été réalisés à la fois avec les MAS-100 (prélèvements fixes) et les CIP 10M (prélèvements fixes et portés par les soignants), des souches de SARM ont été retrouvées dans l'air de 6 chambres, sur les prélèvements par impaction, mais dans aucune des 8 chambres avec les prélèvements fixes réalisés avec les CIP 10M et analysés par PCR.



### Discussion

- Cette étude démontre que les impacteurs mono-étage, disponibles dans de nombreux services d'hygiène hospitalière, peuvent être utilisés pour l'évaluation des expositions des soignants aux agents bactériens transmis par voie aérienne, si l'on dispose de milieux de culture spécifiques.
- Les impingeurs donnent des résultats moins utilisables, soit en raison de leur performance de captage, soit en raison des problèmes posés par la détection par PCR des germes potentiellement impactés sur le liquide de prélèvement.
- Des études complémentaires sont nécessaires dans ce domaine.
- Cette étude a été publiée dans *Journal of Hospital Infection*, (2009;71:256-62).

Contact du projet : Jean François Gehanno,

[jean-francois.gehanno@chu-rouen.fr](mailto:jean-francois.gehanno@chu-rouen.fr)

CHU de Rouen – 02 32 88 82 85

Partenaires du projet :

Service de Médecine du Travail

Service de Bactériologie



## Exposition au virus de l'hépatite E dans les STEP

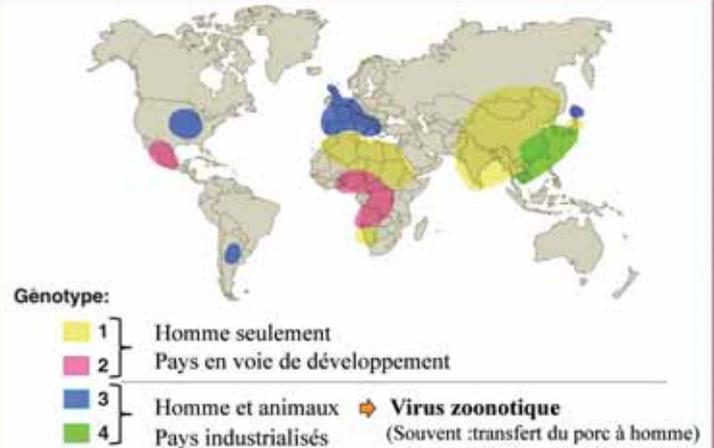
FRÉDÉRIC MASCLAUX, DRITA GASHI, PHILIPPE DUQUENNE, PHILIPP HOTZ, ANNE OPPLIGER

Projet 2009-69 : de mars 2010 à mars 2011

### Le virus de l'hépatite E (VHE)

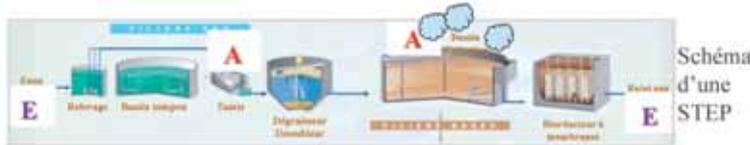
- Virus non enveloppé à ARN 
- Peut provoquer des hépatites aiguës
- Symptômes : jaunisse, fièvre, nausées, douleurs, ...
- Taux de mortalité :
  - Globalement, de 1 à 4 %
- Personnes à risque:
  - Femmes enceintes (mortalité : 15%-25%)
  - Immunodéprimés
  - Malades du foie
  - Personnes âgées
- Voie de contamination : Féco-orale
- Cas en forte augmentation dans les pays industrialisés

### Distribution des génotypes du VHE



### Existe-t-il un risque de contamination pour le travailleur dans la STEP ?

- Les STEP (station d'épuration des eaux usées) sont des points de rassemblement et de brassage des virus entériques, notamment le VHE. Risques pour le travailleur ? Eaux contaminées ? Air contaminé ? Surfaces de contact contaminées ?



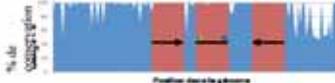
#### Premiers objectifs :

- Mettre au point une méthode de détection du VHE dans les STEP.
- Évaluer la prévalence du VHE dans les eaux des STEP avant ou après traitement.

#### Objectifs à suivre :

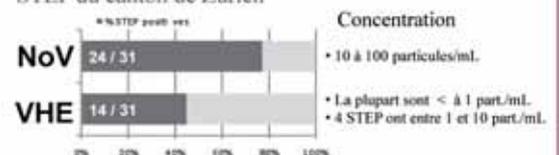
- Déterminer quels sont les génotypes circulants du VHE et leurs origines
- Évaluer le risque de transmission virale dans les STEP

### Méthodologie de détection du VHE

- Choix d'un système de qPCR permettant la détection de tous les variants du VHE 
- Intégration d'un virus contrôle : le RYMV (virus du riz)  
Recherche en parallèle d'un virus très fréquent : le norovirus (NoV)
- Tests de méthodes de concentration des particules virales à partir d'échantillons d'eau
  - ✦ Méthode « filtration » : rétention des particules sur filtres électro-négatifs
  - ✦ Méthode « PEG<sub>8000</sub> directe » : précipitation directe des particules
- Optimisation des méthodes de détection pour assurer fiabilité et reproductibilité
- Vérification de la méthode et recherche préliminaire de VHE dans 31 STEP du canton de Zurich

### Résultats

- Définition de la méthode avec le meilleur rendement et la meilleure reproductibilité :
  - ✦ Méthode PEG<sub>8000</sub> directe
- Résultats de détection du VHE et du NoV dans 31 STEP du canton de Zurich



#### En conclusion :

- Mise au point d'une méthode de détection du VHE
- Mise en évidence de la circulation du VHE dans les STEP suisses (45% des STEP testées sont positives)

Contact du projet : Frédéric Masclaux et Anne Oppliger

Institut universitaire romand de Santé au Travail (IST) ; Rue du Bugnon 21 ; CH-1011 Lausanne  
tél. +41 (0)21 314 70 59 ; fax +41 (0)21 314 74 20 ; frederic.masclaux@hospvd.ch

Partenaires du projet : Philippe Duquenne (INRS), Drita Gashi & Philipp Hotz (Zurich)



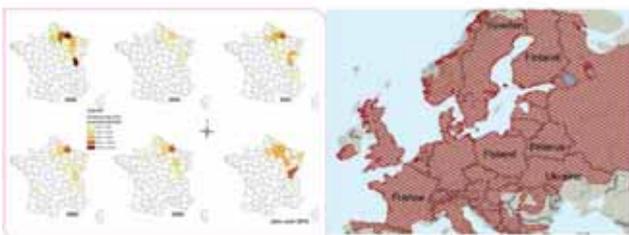
# Un virus cachant son jeu : circulation discrète du hantavirus Puumala et risque pour la santé publique

J.-B. PONS, M. COUTEAUDIER, P. MARIANNEAU, D. AUGOT, D. PONTIER, N. TORDO, F. SAUVAGE  
 Projet 2007-75 : de février 2008 à septembre 2010

## Questions sur une distribution

### Fièvre hémorragique virale à syndrome rénal (FHSR)

- Agent: hantavirus Puumala (PUUV)
- Réservoir: rongeur, campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*)
- Incidence: 10-15 000 cas annuels, 50-250 en France
- Epidémies: zone, ampleur et fréquence croissantes



A) Incidence\* FHSR 2005-2010 B) Distribution\*\* du réservoir

**Constat:** distribution des cas humains de FHSR < celle du rongeur

#### Objectifs:

- Comprendre la distribution française des cas humains de FHSR
- Préciser la zone où circule le hantavirus Puumala
- Comprendre les facteurs écologiques du risque d'exposition
  - Dynamique du rongeur dans les ≠ zones,
  - Phylogénie des souches de PUUV ...

## Hypothèse explorée

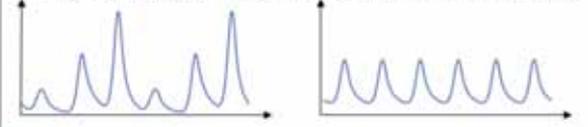
- Circulation du virus Puumala entre les campagnols et l'Homme



- Contamination de l'homme via poussières contaminées  
 ⇒ n'explique pas la géographie

#### Eléments additionnels:

- dynamique d'excrétion
- ≠ dynamique du rongeur hors zone d'endémie (ZE)



**H0: circulation du PUUV à bas bruit hors de la ZE**

#### Méthodologie:

- Captures de rongeurs 2x .an<sup>-1</sup> (printemps/automne) ou CMR (5x .an<sup>-1</sup>, Ardennes) UMR 5558
- Sérologie / PCR / Séquençage CNR FHV/Ubive
- Modélisation (statistique et dynamique) UMR 5558

## Résultats et perspectives

| Département           | Saison | N <sub>maître piége</sub> | N <sub>CR</sub> | Séro+ |
|-----------------------|--------|---------------------------|-----------------|-------|
| 08                    | P      | 6801                      | 311             | 57    |
|                       | A      | 2352                      | 114             | 20    |
| 10+25+55              | P      | 2130                      | 208             | 70    |
|                       | A      | 1620                      | 22              | 2     |
| 01,<br>03,19,45,85,91 | P      | 7251                      | 267             | 18    |
|                       | A      | 5496                      | 249             | 10    |
| Total                 | P      | 16182                     | 786             | 145   |
|                       | A      | 9468                      | 385             | 32    |

- Zone d'endémie (ZE)
- Zone de cas sporadiques (ZS)
- Zone indemne de FHSR (ZI)

\*:source INVS, point au 02/07/2010 \*\*: IUCN Red List 2011

**Résultats:** validation partielle de l'hypothèse

- Circulation régulière du PUUV au-delà de la ZE
- Dynamique fluctuante du réservoir hors de la zone d'endémie (ZE)
- Hétérogénéité des souches circulant en France

#### Perspectives:

- Risque d'émergence en zone « indemne » (ZI)?
- Importance relative des ≠ facteurs  
 ⇒ souche PUUV-réservoir-environnement-activité humaine
- Travaux de phylogénie et de terrain (hiver) en cours

Contact du projet : Frank, SAUVAGE

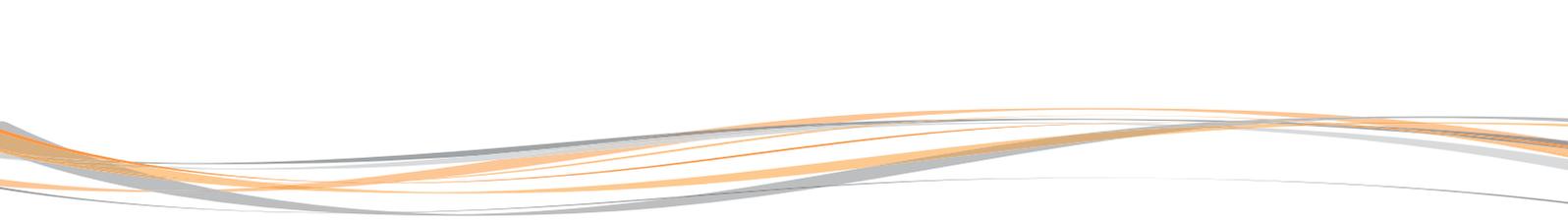
04 72 43 13 37 – 04 72 43 13 88; frank.sauvage@univ-lyon1.fr



Partenaires du projet : LBBE UMR-CNRS 5558, UBIVE – CNR Fièvres Hémorragiques Virales







**anses**  
agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



Agence nationale de sécurité sanitaire  
de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
27-31 avenue du général Leclerc  
94701 Maisons-Alfort Cedex  
[www.anses.fr](http://www.anses.fr)