

MASTER RECHERCHE IMU 2017

Résumé scientifique

A retourner à : imu_pilotage@liris.cnrs.fr

Titre : *La ville souterraine : gestion des réseaux d'eaux usées et dangers sanitaires associés*

Nom : Rayan Bouchali

E-mail : rayan.bouchali@etu.umontpellier.fr

Noms des encadrants :

- (1) Benoit Cournoyer (LEM, membre IMU), UMR Ecologie Microbienne, U. Lyon 1 & VetAgro Sup
- (2) Gislain Lipeme-Kouyi (DEEP, membre IMU), INSA Lyon
- (3) Samuel Lacaille (Grand Lyon, IMU), Pôle Surveillance et pilotage des flux, DDUCV - Direction de l'Eau - Exploitation réseaux ESX

Domaines d'investigation IMU concernés par le sujet :

➔ **Risques urbains et environnement**

Éléments de contexte explicitant le positionnement du sujet au sein du labex IMU

Le stage a été divisé en deux parties : (1) une enquête auprès du service d'exploitation des réseaux unitaires (eaux de pluie et usées – (EU)) et séparatifs (eaux usées) de la métropole de Lyon devant préciser les dangers chimiques et microbiologiques rencontrés dans le cadre des activités de maintenance des réseaux, et (2) l'acquisition de nouvelles données permettant d'améliorer la qualification de certains dangers et d'envisager une évolution de certaines pratiques. Le point (1) a été coordonné par S. Lacaille et a impliqué l'analyse de documents sur les risques liés à une exploitation de réseaux unitaires et séparatifs. Le point (2) a impliqué l'analyse des dangers liés aux émissions de sulfure d'hydrogène (H₂S), et la cooccurrence de médicaments et d'agents biologiques pathogènes dans les réseaux.

Ce sujet a permis une structuration originale autour des risques sanitaires en ville liés à la gestion des eaux usées. La gestion des eaux usées en milieu urbain représente une préoccupation forte découlant de périodes sombres de notre histoire où des épidémies majeures sont survenues e. g. peste noire, choléra, suite à une contamination microbiologique de nos réserves en eau potable par les eaux usées. De nouvelles préoccupations font désormais surface avec l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques dont les *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (e. g. Santajit and Indrawattana. 2016. BioMed Research International, Article ID 2475067) pouvant transiter dans ces réseaux, et transmettre leur patrimoine génétique aux autres espèces bactériennes. De plus, la volonté politique d'une utilisation des eaux grises (douches, éviers, etc) et pluviales (toitures, ruissellement urbain) pour certaines pratiques urbaines relance les débats sur leur dangerosité (e. g. www.anses.fr/fr/content/réutilisation-des-eaux-grises-pour-des-usages-domestiques-une-pratique-à-encadrer). Le patrimoine actuel de la métropole de Lyon présente 3193 km d'égouts. Ce réseau est complété par des stations de métrologie dont des stations pluviométriques et de mesure de qualité, permettant d'évaluer les flux de matières transitant dans ces réseaux. Ce projet a permis de confronter les pratiques actuelles et perception des risques sanitaires au niveau du service responsable de l'exploitation de ce réseau, de préciser les nouveaux dangers microbiologiques pouvant impacter ce réseau, et d'analyser la perception des personnels du service d'exploitation face à ces dangers.

Résumé scientifique des principales réalisations

(1) Bilan de l'enquête auprès du service d'exploitation des réseaux unitaires (eaux de pluie et usées – (EU)) et séparatifs (eaux usées) de la métropole de Lyon

Le métier d'égoutier, dont le rôle principal est l'entretien des réseaux d'eaux usées, expose les opérationnels à divers dangers qui pouvant être responsables d'une baisse de leur espérance de vie (jusqu'à 17 ans par rapport à une population témoin). Ces risques peuvent être très divers : physiques, biologiques ou chimiques (Fig. 1). Les risques physiques vont regrouper toutes sortes de coups/chocs mais aussi des troubles musculaires squelettiques (TMS). Les risques biologiques concernent tous les micro-organismes pathogènes qu'il est possible de retrouver dans les eaux usées (bactéries, virus, parasites) dont des bactéries pathogènes stricts des genres *Salmonella*, *Shigella* ou *Campylobacter* (Mara and Horan, 2003), certains agents pathogènes opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas caviae* (Wheater *et al.*, 1980 ; Monfort and Baleux, 1990). La présence

de toxines bactériennes et mycotoxines peuvent également conduire à des allergies et de l'asthme. Des virus pathogènes sont également présents dans ces milieux, dont les adénovirus (pharyngites, pneumonies, conjonctivites) et les parainfluenzae virus (bronchiolite, trachéites). Il a ainsi été observé que les taux d'anticorps anti-adénovirus et anti-parainfluenzae virus sont plus élevés chez les travailleurs en contact avec les eaux usées, suggérant un contact étroit avec ces particules virales (Altemyer *et al.*, 1990). La présence de parasites dans les eaux usées a aussi été montrée, comme *Giardia intestinalis*, responsables de fortes diarrhées (Wallis *et al.*, 1996).

Les risques chimiques résultent de l'exposition des agents à différentes substances provenant de l'utilisation de l'eau en amont, mais pouvant également être formées par des mécanismes bactériens. C'est le cas du Sulfure d'Hydrogène (H_2S) qui provient de la transformation bactérienne de composés organiques soufrés ou de sulfates retrouvées dans les réseaux. Cette molécule représente un risque de par son effet toxique pour l'Homme. Selon la médecine du travail du Grand Lyon, ce gaz peut conduire, en fonction des concentrations, à des intoxications aiguës (troubles respiratoires, irritations oculaires, céphalées, vertiges, conjonctivites), à des pertes de connaissance (à partir de 500 ppm) et même à la mort (> 1000 ppm). Une immersion dans les équipes d'égoutiers de la ville de Lyon a permis de montrer que les risques chimiques demeurent peu connus, hormis ceux concernant le H_2S , pour lequel un suivi des alertes (concentrations > 10 ppm, mesurée à l'aide d'un détecteur de gaz porté par les agents) a été mis en place. Ce suivi fait suite à une intoxication grave survenue en 2013. Depuis, plus de 120 intoxications ont pu être répertoriées. Les risques biologiques restent également méconnus, mais des diarrhées et doux grasses sont récurrentes chez les égoutiers.

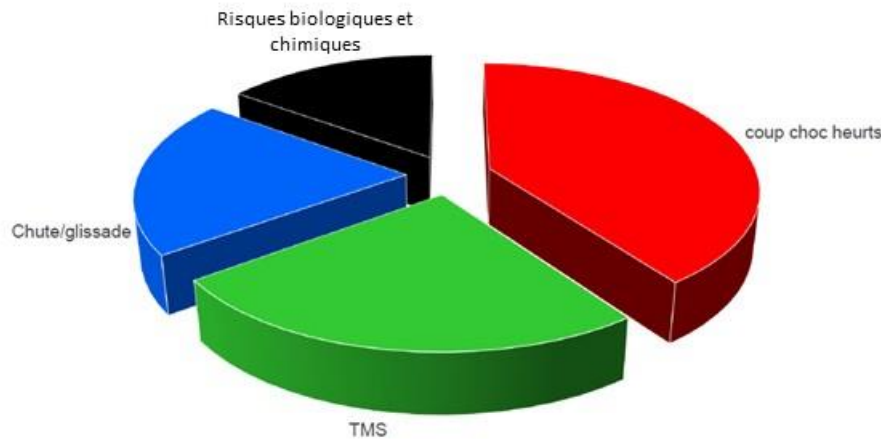


Figure 1 : Diagramme illustrant les différents risques répertoriés et leur prévalence pour les égoutiers de la ville de Lyon (source : Fabien Kapp, Grand Lyon). TMS : troubles musculaires squelettiques.

(2) Acquisition de nouvelles données permettant d'améliorer la qualification de certains dangers et d'envisager une évolution de certaines pratiques

Des observations faites par l'une des équipes de recherche impliquées dans l'encadrement de ce stage M2 suggèrent qu'une enzyme, la thiopurine-S-méthyltransférase (bTPMT) pourrait avoir une activité de détoxification des substances soufrées, dont le H_2S , et expliquer la présence de certaines formes pathogènes de l'Homme dans les réseaux. La thiopurine-S-méthyltransférase est une enzyme cytoplasmique présente chez les mammifères (dont l'Homme), les levures et les bactéries. Chez les bactéries, cette enzyme est codée par le gène *tpm*, présent chez les γ -protéobactéries, et son évolution est cohérente avec celles de gènes marqueurs universels utilisés en phylogénie moléculaire (histoire évolutive de l'ADN) dont ceux codant les ARN ribosomiques (Favre-Bonte *et al.*, 2005). Le gène *tpm* peut donc être utilisé comme marqueur métacodes-barres (signature d'ADN) pour l'étude de la répartition des bactéries bTPMT +. La bTPMT confère aux bactéries une résistance aux oxyanions à base de Sélénium (séléniate et sélénite) et Tellurium (tellurite et tellurate) mais d'autres substrats pourraient expliquer sa conservation. La bTPMT peut en effet méthyler ces composés fortement oxydants (donc toxiques) en di-méthylSélénide (DMS₂) ou di-méthylDiSélénide (DMDSe) et en di-méthylTelluride (DMTe) ou di-méthylDiTelluride (DMDTe), des formes chimiques non toxiques et volatiles. Lors de ces analyses sur le Tellurium/Sélénium, une méthylation du Soufre par la bTPMT en di-méthylSulfur (DMS) et di-méthylDiSulfur (DMDS) a été observée. Cette enzyme aurait donc également une affinité pour divers substrats soufrés. Ce rôle de détoxification de substances soufrées n'avait pas été étudiée à ce jour hors contexte de la méthylation des thiopurines (médicament pour lutter contre le cancer), et pourrait en partie expliquer certains biais dans la répartition des bactéries exprimant la bTPMT.

(a) La première phase de ce travail a donc été d'étudier les biais de répartition des bactéries pouvant exprimer la bTPMT dans des milieux fortement contaminés par des médicaments et pouvant également conduire à une production de sulfure d'hydrogène (H_2S), c'est-à-dire les réseaux unitaires (chargés de collecter les eaux usées et

pluviales). Pour cette étude, des roches ont été placées dans les clarificateurs de la station d'épuration de Bellecombe (Scientrier, Haute-Savoie) qui a la particularité de traiter les eaux usées hospitalières et urbaines de manière distincte. Les biofilms formés sur les roches ont été prélevés. Lors de la récupération des biofilms, des descripteurs du milieu ont été mesurés par l'INRA de Thonon (Chonova *et al.*, 2016) ainsi que les concentrations de plusieurs médicaments par Lebanowski *et al.* (Pers. Comm., Université de Poitiers / Ecole nationale Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers). Les relations et corrélations entre ces données (notamment les concentrations en médicaments) et la présence des espèces bTPMT+ dans les biofilms collectés ont été recherchées durant ce stage par approches bio-informatiques.

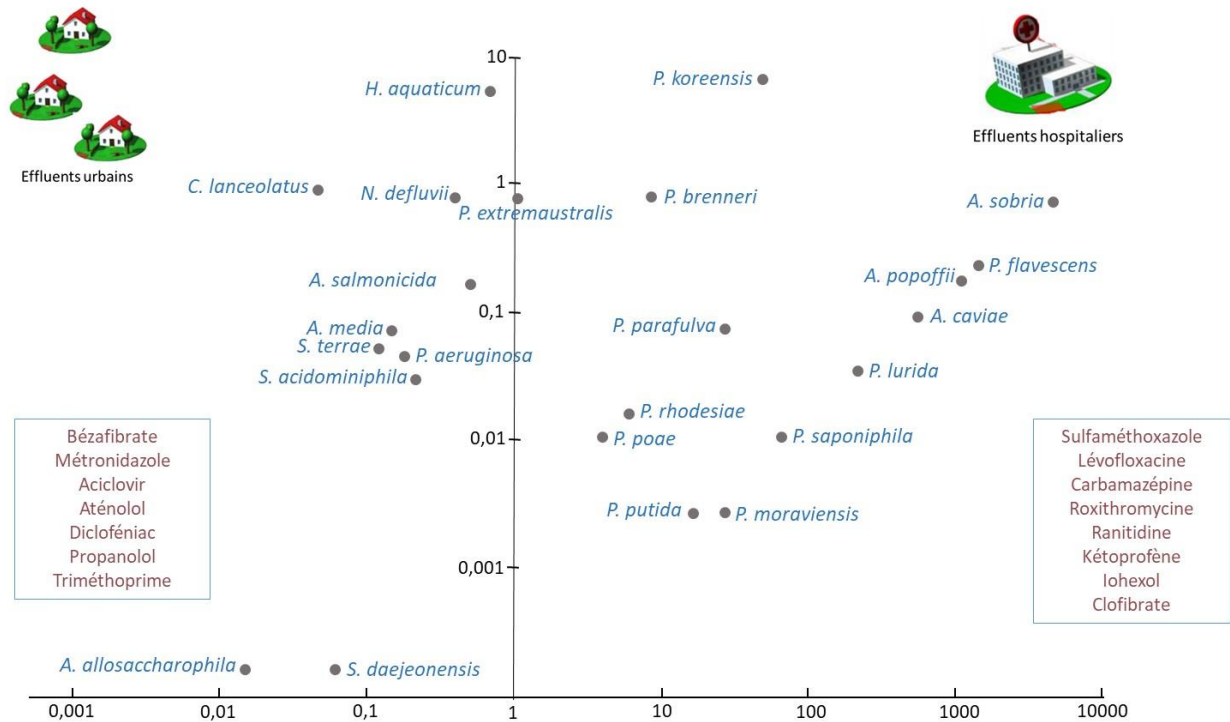


Figure 2 : Analyse des biais de distribution des espèces en fonctions des abondances relatives des espèces bactériennes des biofilms des clarificateurs. L'axe des abscisses représente la valeur du ratio entre l'abondance des reads tpm des biofilms de la filière hospitalière et la filière urbaine pour une espèce donnée. L'axe des ordonnées représente l'abondance relative d'une espèce selon les reads tpm des biofilms de la filière hospitalière. Plus les points sont placés en haut à droite plus le nombre de séquences était élevé dans la filière hospitalière. Les molécules médicamenteuses présentées montraient une occurrence plus élevée dans la file urbaine (à gauche) ou hospitalière (à droite)

Ces études ont montré une forte différenciation des structures bactériennes bTPMT+ dans les deux types d'effluents étudiés (hospitaliers et urbains). Tout d'abord, les biofilms de la file hospitalière montraient une richesse spécifique (designant le nombre d'espèce, la diversité présente dans un milieu) moins élevés que ceux de la file urbaine. Des analyses par PCoA (Principal Coordinates Analysis – metric multidimensional scaling) ont montré une différenciation significative entre les structures bactériennes des biofilms de la file hospitalière et ceux de la file urbaine. Il a été montré que cette différenciation pouvait être expliquée par certaines variables comme leur composition physico-chimique et les concentrations en médicaments. En effet, certains médicaments étaient restreints à la file hospitalière (Sulfaméthoxazole, Lévofloxacine, Carbamézépine, Roxithromycine, Ranitidine, Kétoprofène, Iohexol et Clofibrate) et d'autres à la file urbaine (Epoxy-carbamazépine, Bézafibrate, Métronidazole, Aciclovir, Aténolol, Diclofénac, Propanolol et Triméthoprime) (Fig. 2). Cette différenciation s'explique par l'utilisation de ces molécules en amont. L'Iohexol est, par exemple, un produit de contraste utilisé en radiologie (Papoutsakis *et al.*, 2015), il est donc normal de le retrouver davantage dans les biofilms de la file hospitalière. Des tests statistiques ont montré des relations significatives entre les structures bactériennes bTPMT+ observées et certaines molécules plus concentrées dans la file urbaine (Caféine, Aténolol, Diclofénac, Propanolol) ou hospitalière (Iohéxol, Lévofloxacine, et Ranitidine). Les allocations taxonomiques ont permis de mettre en évidence une OTU (Unité Taxonomique Opérationnelle, utilisée pour regrouper des individus phylogénétiquement proches), l'Otu0001 (n=44049 reads) principalement présente dans les biofilms de la file hospitalière. Cette OTU a pu être relié, avec 74 % de similarité, à un endosymbionte non isolé ayant un rôle d'oxydation du Soufre (sulfuroxidizing symbionts de *Riftia pachyptila* - un ver tubicole géant). Cette inférence est une observation majeure lorsque mise en relation avec les fonctions de détoxification de substances soufrées de la bTPMT. D'autres espèces des genres *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* et *Aeromonas* ont pu être identifiées, dont certaines présentant des biais de répartition. En effet, des espèces pouvant être des pathogènes opportunistes de l'Homme ont été davantage

observées dans les effluents hospitaliers, comme *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens*. Il semble que cette différenciation au niveau des structures bactériennes observées entre files serait liée au différentiel dans le contenu en substances médicamenteuses. Différentes OTUs *tpm* auraient été sélectionnées en fonction de leur résistance et de leur capacité de détoxification des cocktails de médicaments présents dans ces deux files d'épuration. La bTPMT pourrait avoir un rôle dans ces mécanismes de résistance/détoxification mais ne peut pas expliquer toutes les différenciations de structures bactériennes observées. Il existe donc probablement d'autres mécanismes de résistance expliquant certains des biais de répartition observés tels que l'acquisition de gènes de résistances aux antibiotiques.

(b) La deuxième phase de ce stage expérimental a été d'explorer les substrats possibles de la bTPMT chez une espèce bactérienne modèle, *Pseudomonas aeruginosa*, pour expliquer les biais de répartition observés dans la section précédente. Cette bactérie montre de nombreuses résistances aux antibiotiques et peut être un pathogène opportuniste de l'Homme, notamment chez les patients immunodéprimés ou atteints de mucoviscidose. Afin de préciser les résistances conférées par cette enzyme, une souche sur-productrice de bTPMT ainsi qu'un mutant ont été construits. Ces bactéries génétiquement modifiées ont été soumises à des tests d'antibiogramme, de résistance au tellurite, et des phénotypage à haut débit des résistances aux antimicrobiens avec la méthode Omnilog (Kéragart *et al.*, 2018). L'Omnilog mesure la croissance bactérienne en présence de $n = 240$ molécules.

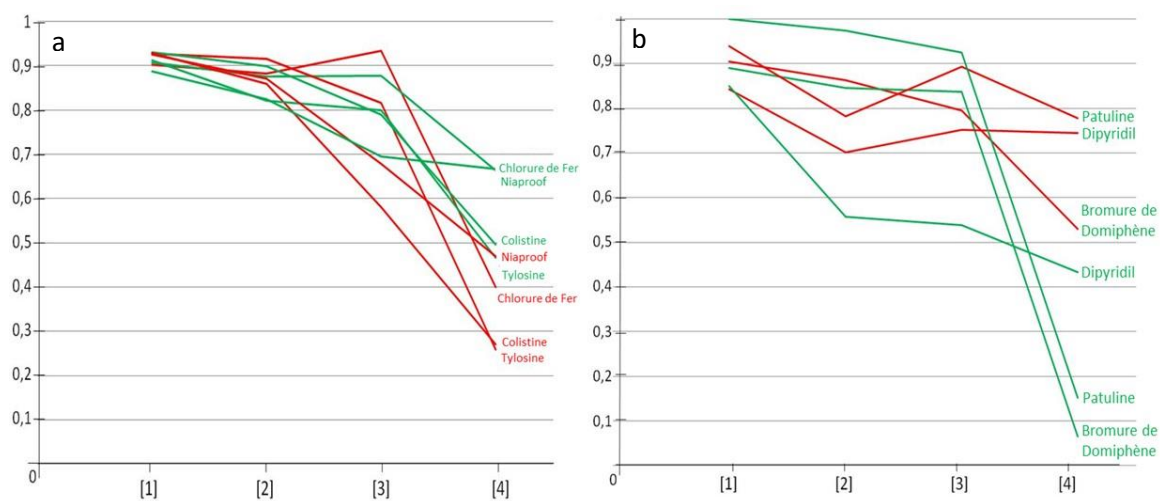


Figure 3 : Analyse comparative de la croissance de *P. aeruginosa* en présence de divers antimicrobiens. Les molécules favorisant (a) ou défavorisant (b) la croissance de la souche de *P. aeruginosa* surexprimant la bTPMT (en vert) sont présentées. La souche mutée au niveau du gène *tpm* est représentée en rouge. Les concentrations en antimicrobiens sont croissantes ([1] < [4]). Une valeur inférieure à 0,5 en ordonnée est considérée comme une inhibition significative de la croissance.

Les tests de résistance au tellurite et les antibiogrammes n'ont montré aucune différence de résistance entre la souche mutante et la souche surproductrice de bTPMT. Les tests de résistance au tellurite ont permis de valider la surproduction de l'enzyme grâce à la perception d'une odeur métallique chez le surproducteur et pas chez la souche mutante. Cette odeur est typique du DMTe et du DMDTe, les produits de méthylation du tellurite (Cournoyer *et al.*, 1998). Des différences de résistance à plusieurs molécules ont pu être observées grâce au phénotypage à haut débit réalisé avec l'Omnilog (Fig. 3). En effet, la souche surproductrice s'est montrée davantage résistante au chlorure de fer, au Niaproof (un détergent), à la colistine et la tylosine (antibiotiques). Par contre, cette souche surproductrice s'est montrée plus sensible que la souche mutante à la patuline (une mycotoxine), au Bromure de Domiphène (antiseptique) et au 2,2'-dipyridil. La diminution de la sensibilité peut être expliquée par la méthylation par la bTPMT des molécules testées ou de leur cible, inactivant leur effet bactéricide. L'augmentation de la sensibilité est plus difficile à expliquer mais il est possible que la bTPMT forme des sous-produits toxiques pour la bactérie.

(3) Conclusions générales

Ces études ont permis de mettre en évidence la ségrégation des molécules médicamenteuses en fonction de la file de traitements des eaux usées (urbaines ou hospitalières). Cette ségrégation a été reliée à des biais de distribution de certaines espèces bactériennes dont des formes pathogènes. Le poids de l'enzyme bTPMT dans l'organisation de cette diversité reste à déterminer, bien qu'un rôle de détoxification de certains antimicrobiens ait pu être mis en avant durant l'étude. Pour les opérationnels, ces résultats indiquent la nécessité de documenter l'origine des eaux usées et leur cheminement pour préciser les niveaux de danger en réseau lors des interventions.