



GDS
France

Projet MethaRisk

Analyse de **matrices environnementales complexes**
pour le suivi d'**agents pathogènes** dans le cadre d'une
méthanisation collective

WEBINAIRE UMT SABRE – 26 MARS 2026

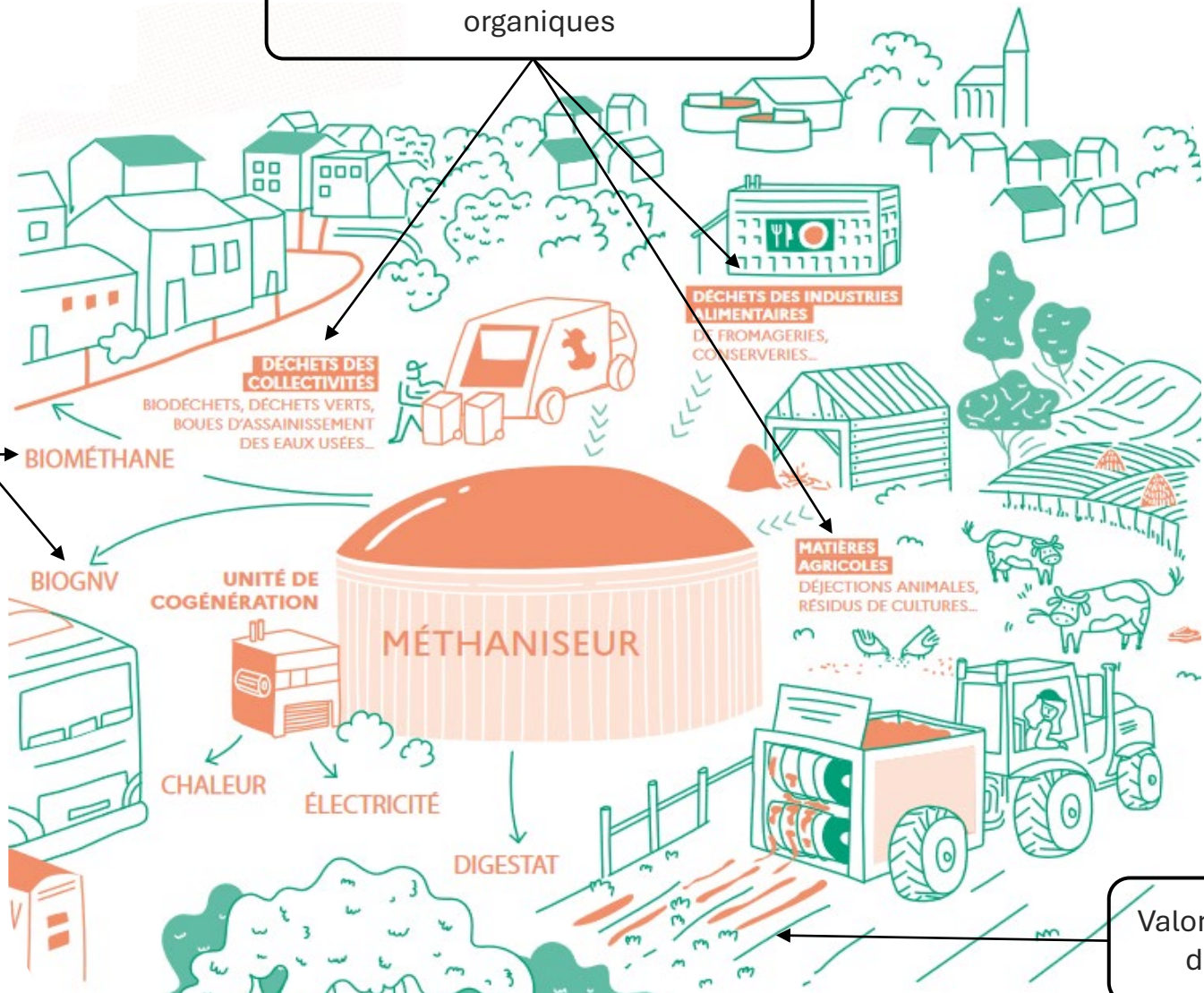
Aurélie Couesnon, Alizée Raptopoulo - Unité Fièvre Q animale – Anses Sophia Antipolis

CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER

Méthanisation

Processus de dégradation de la **matière organique** dans un milieu **sans oxygène**, due à l'action de **multiples bactéries** qui va produire du **biogaz** ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$) et un **fertilisant (digestat)**

Réduction et valorisation des déchets organiques



Production d'énergies renouvelables

Valorisation du digestat

1 — Objectifs et mise en place du projet

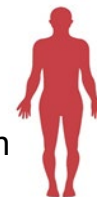
Pourquoi le projet MethaRisk ?

Contexte :

- Méthanisation collective en pleine expansion
- **Peu de données** sur les **risques sanitaires** potentiels associés **aux pathogènes** présents dans les **intrants et extrants**
- Besoin de **données scientifiques** robustes pour **orienter la réglementation** en **méthanisation collective**

Deux pathogènes sélectionnés pour le projet :

- ***C. burnetii* (Cb)**, agent de la fièvre Q (avortements et troubles de la reproduction en élevages, **zoonose**)
- ***M. avium ssp. Paratuberculosis* (MAP)**, agent de la *paratuberculose* (inflammation chronique de l'intestin)
 - Répandus dans les effluents d'élevages de ruminants
 - Considérés persistants dans les environnements agricoles
 - Pouvant être présent en quantité importante dans les fumiers



Objectifs principaux :

- Mettre en place des **méthodes standardisées** et **validées** pour l'analyse des **matrices complexes** comme le **fumier** ou les **digestats** solide et liquide.
- Décrire l'évolution des **charges bactériennes** de **deux pathogènes** considérés **résistants aux stress environnementaux**, par **PCR**, durant un an dans des **méthaniseurs collectifs**.

Limites de l'étude *a priori*

1 - Processus de méthanisation



- **Alimentation d'intrants en continu**, empêchant l'**évaluation** de l'impact des conditions (dont l'hygiénisation)
- Pas de lien direct entre un lot d'intrant et un lot de digestat du fait du flux continu

2- Hétérogénéité du prélèvement dans les matrices des méthaniseurs



- Représentativité du prélèvement pouvant être affectée lors de l'échantillonnage sur site et lors de la préparation au laboratoire
- Possibilité de faux négatifs (non-détections) en raison de l'hétérogénéité des matrices.

3- Méthode d'analyse par PCR (pas de données sur la viabilité)



- Présentation d'une technique de mesure de la viabilité en conclusion




4- Analyse du risque : beaucoup d'autres critères sont à prendre en considération

- Souche bactérienne : **viabilité**, **virulence** (persistance, infectiosité, taux abortif, ...)
- Modes et **conditions d'épandage des digestats** (enfouissement, vent, humidité, température, ...)
- **Exposition** des animaux et des personnes (distance lors de l'épandage, port de matériel de protection individuelle, ...)
- Statut **immunitaire** des hôtes potentiels (immunocompétent ou non, naïfs ou immunisés, ...)



Comment nous avons procédé ?

Méthodologie :

- **Méthaniseurs suivis** : 3 méthaniseurs collectifs en flux continu
 - intrants issus d'élevages de ruminants (indicateurs Cb et/ou MAP)
- **Matrices biologiques analysées** : fumier (intrant), digestat liquide et digestat solide (produits)
- **Procédure de prélèvements** : définie pour garantir des mélanges représentatifs
- **Fréquence** : suivi mensuel sur une année (de mars 2023 à février 2024)
- **Méthode d'analyse** :
 - 1/ optimisation de l'**homogénéisation** de la matrice 
 - 2/ optimisation **de l'extraction** de l'ADN à partir de chaque matrice 
 - 3/ choix de l'**outil analytique** pour **mesurer la quantité de bactéries** dans le prélèvement : 
 - **PCR digitale** : quantification de **Cb** (gène monocopie ICD, gène multicopie IS1111)
 - **PCR en temps réel** : quantification de **MAP** (gène multicopie IS900)
 - 4/ **validation** de la méthode complète

Besoin de matrices d'intérêt de statut négatif pour **optimiser** la préparation des matrices et **valider** la méthode PCR

2 — Optimisation de la méthode et choix de l'outil analytique PCR

Optimisations de la préparation des matrices : points critiques

Matrice brute -> 🔄 Homogénéisation -> 🧪 Lyse -> 🧬 Extraction ADN total -> Analyse PCR

Nature de la matrice

1 . Dilution de l'échantillon

Filtere : élimination des grosses particules (> 250 µm)

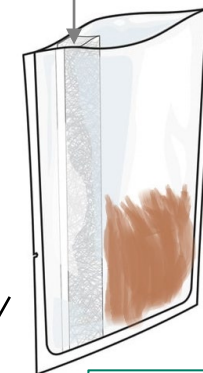
Echantillon brut



+



40 ml
PBS

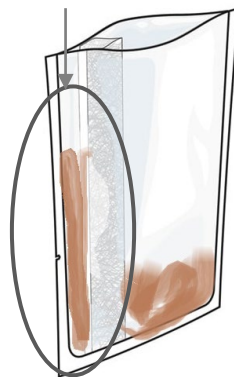


Sac pour mélanger et filtrer l'échantillon

Echantillon homogénéisé et filtré
prêt pour analyse



Echantillon filtré



2 . Homogénéisation et filtration de l'échantillon

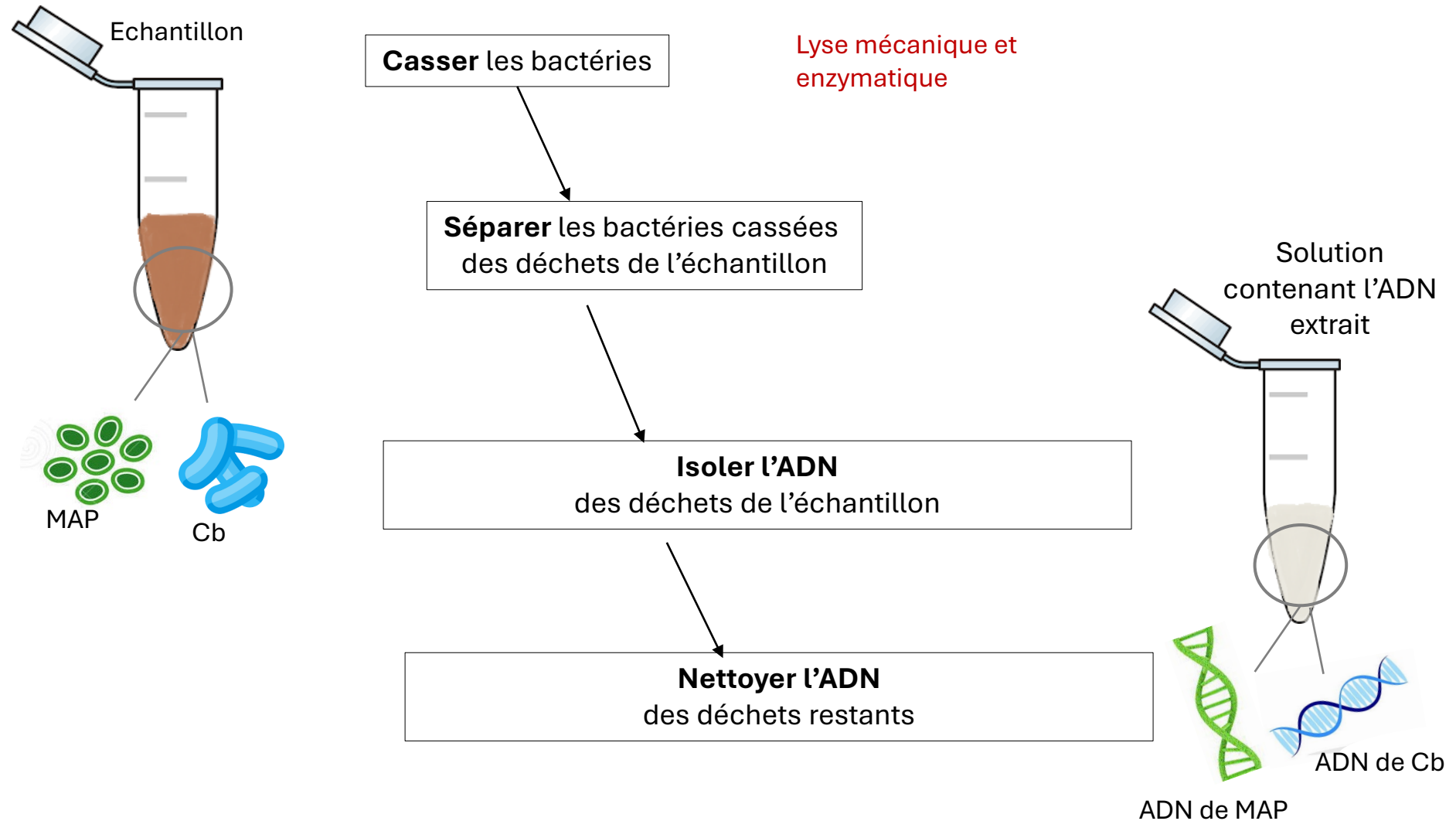


Appareil pour malaxer le sac contenant l'échantillon

3 . Récolte de l'échantillon filtré

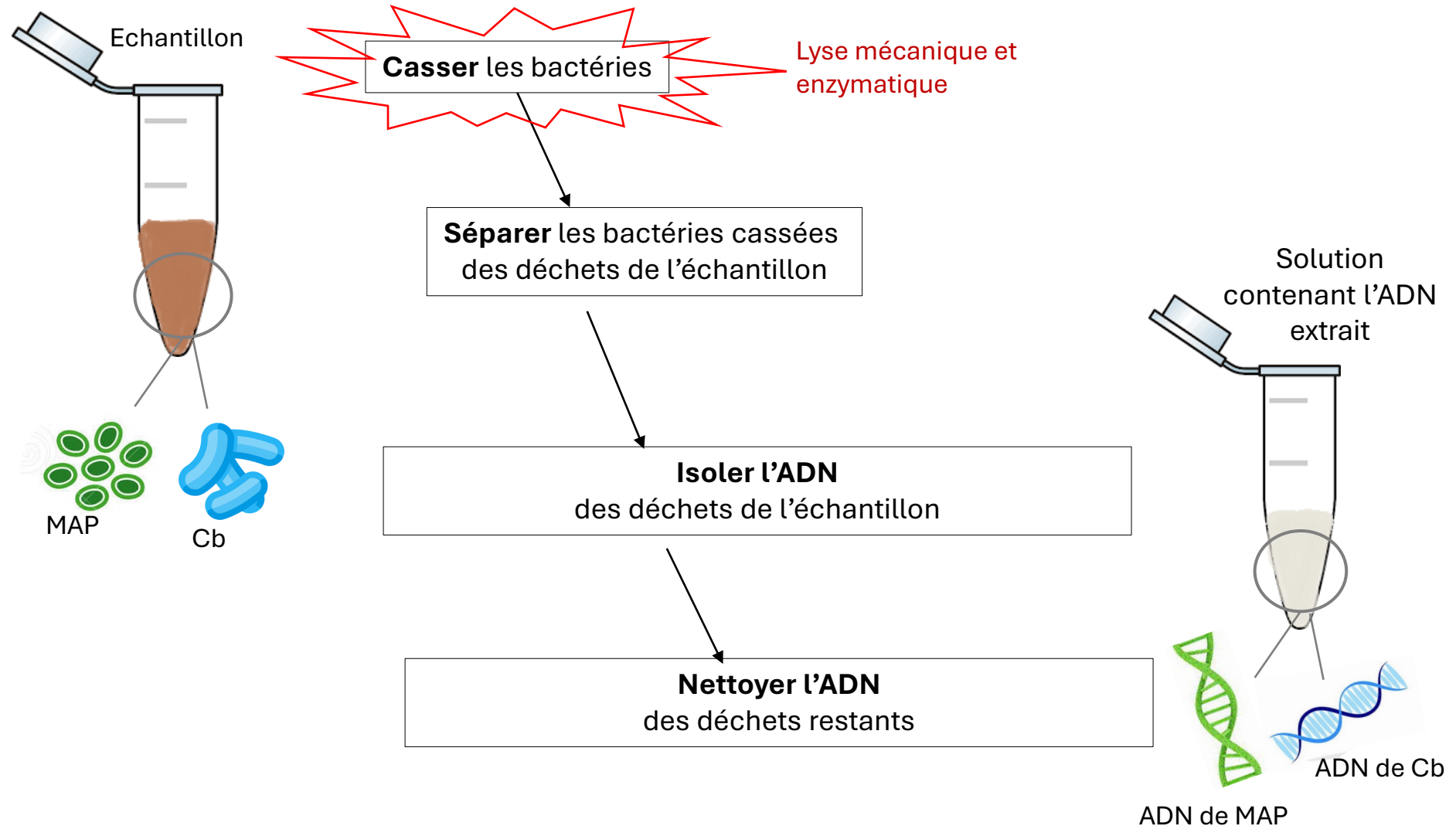
Optimisations de la préparation des matrices : points critiques

Matrice brute ->  Homogénéisation ->  Lyse ->  Extraction ADN total -> Analyse PCR



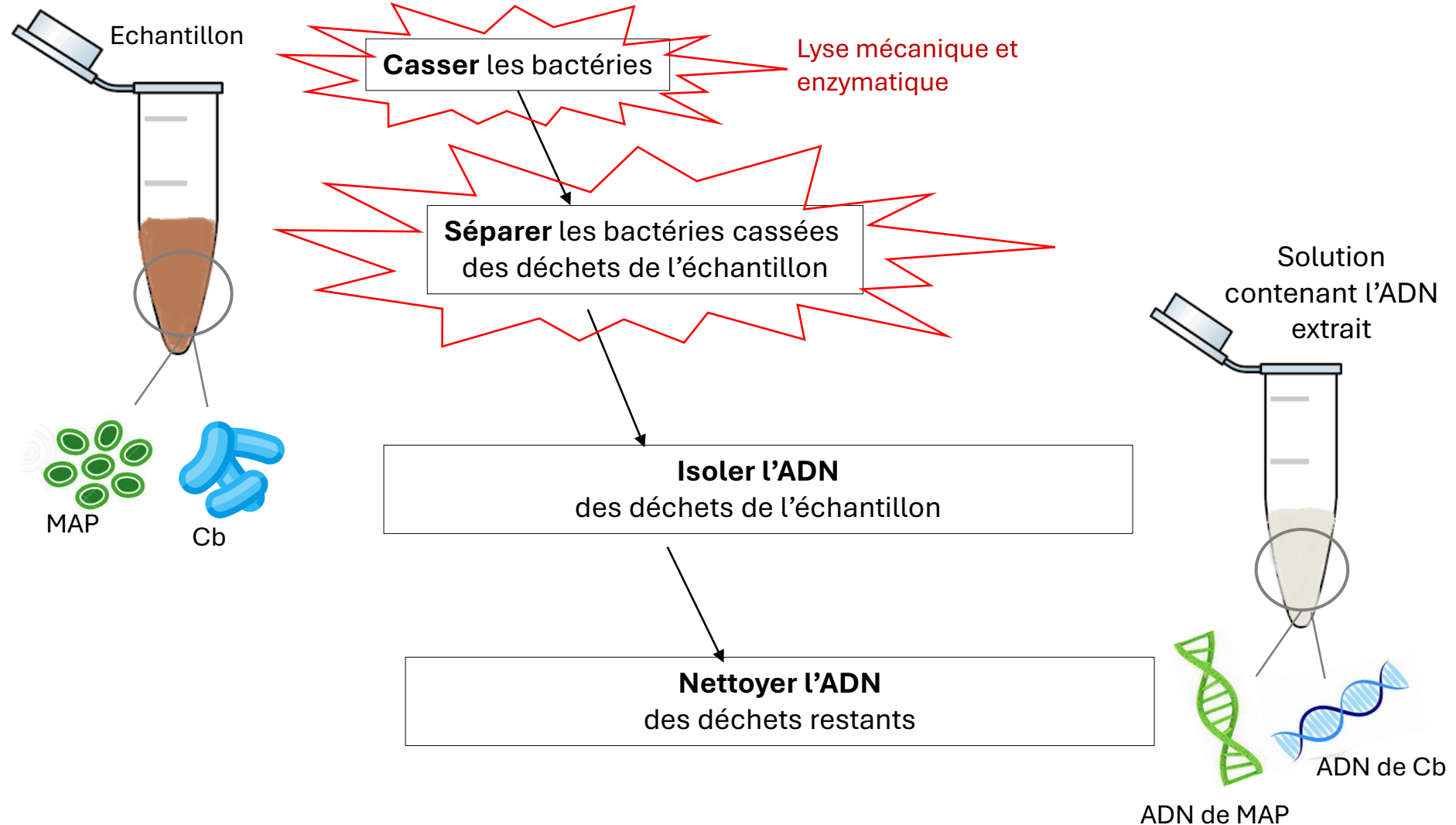
Optimisations de la préparation des matrices : points critiques

Matrice brute ->  Homogénéisation ->  Lyse ->  Extraction ADN total -> Analyse PCR



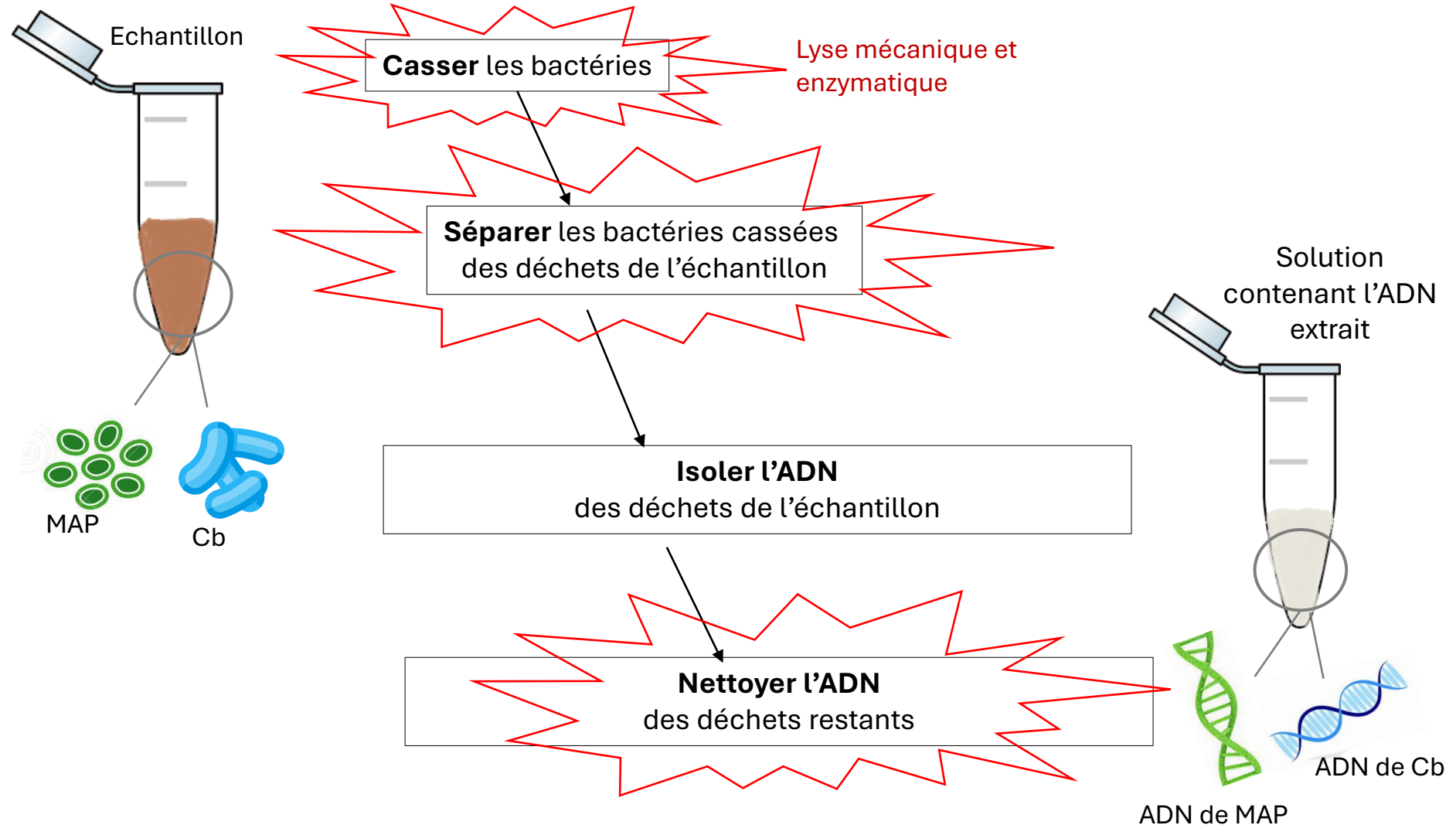
Optimisations de la préparation des matrices : points critiques

Matrice brute ->  Homogénéisation ->  Lyse ->  Extraction ADN total -> Analyse PCR



Optimisations de la préparation des matrices : points critiques

Matrice brute -> 🔄 Homogénéisation -> 🧪 Lyse -> 🧬 Extraction ADN total -> Analyse PCR



Choix de l'outil analytique : PCR temps réel (MAP)

Matrice brute -> 🔄 Homogénéisation -> 🧪 Lyse -> 🧬 Extraction ADN total -> Analyse PCR

Validé sur matrice fèces

Kit commercial

EPC intégré (plasmide)

Système qPCR « ready to use »
pour la détection d'un gène
multicopie (IS900)

Sensibilité aux inhibiteurs sans
dilution de l'échantillon



Pas de connaissance des séquences
d'amorces et de sondes



Pas de multiplexage possible



Choix de l'outil analytique : PCR digitale (Cb)


Matrice brute ->  Homogénéisation ->  Lyse ->  Extraction ADN total -> Analyse PCR


Matrice complexe
riche en inhibiteurs


Eviter la dilution d'échantillon
(sensibilité)


Système qPCR maison pour
la détection d'un gène
multicopies (IS1111)


Volonté d'y intégrer un EPC
et la détection d'un gène
monocopie (ICD)
(multiplexage)

Meilleure gestion des inhibiteurs sans
dilution de l'échantillon 

Adaptation facile du système qPCR
maison à la PCR digitale 

Facilite le
multiplexage 

Quantification absolue 

Pas d'utilisation de gamme
standard 

Gamme de quantification réduite 

Difficulté d'établir une limite de blanc 

Validation de méthode complète

Connaitre les **performances de la méthode complète** sur la **matrice biologique d'intérêt** pour

- assurer des résultats fiables
- **comparer les données** dans une même étude
- gage de **crédibilité scientifique**

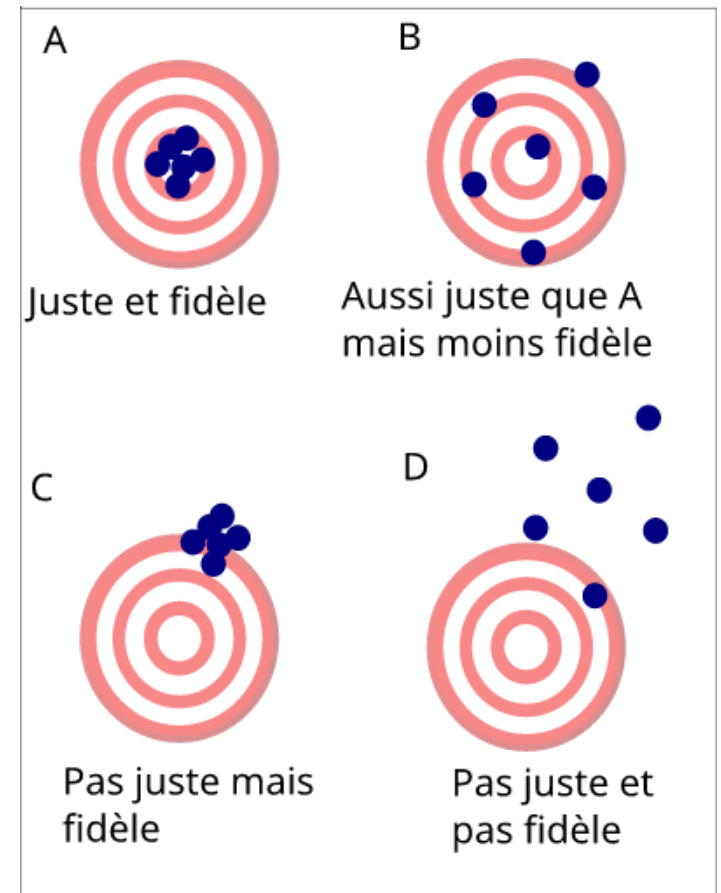
Selon la norme AFNOR : **NF U47-600-2** (relative à la santé animale)

Evaluation par :

- La **justesse** (biais)
- La **fidélité** (répétabilité et reproductibilité)

Réalisation d'un profil d'exactitude avec correction de biais

- La limite de quantification
- La limite de détection



3 — Résultats du suivi longitudinal d'un méthaniseur et discussion

Méthaniseur sélectionné

Composition des Intrants

Ajout constant d'intrants selon:
60 % de déchets d'origine animale

20 à 25% végétal

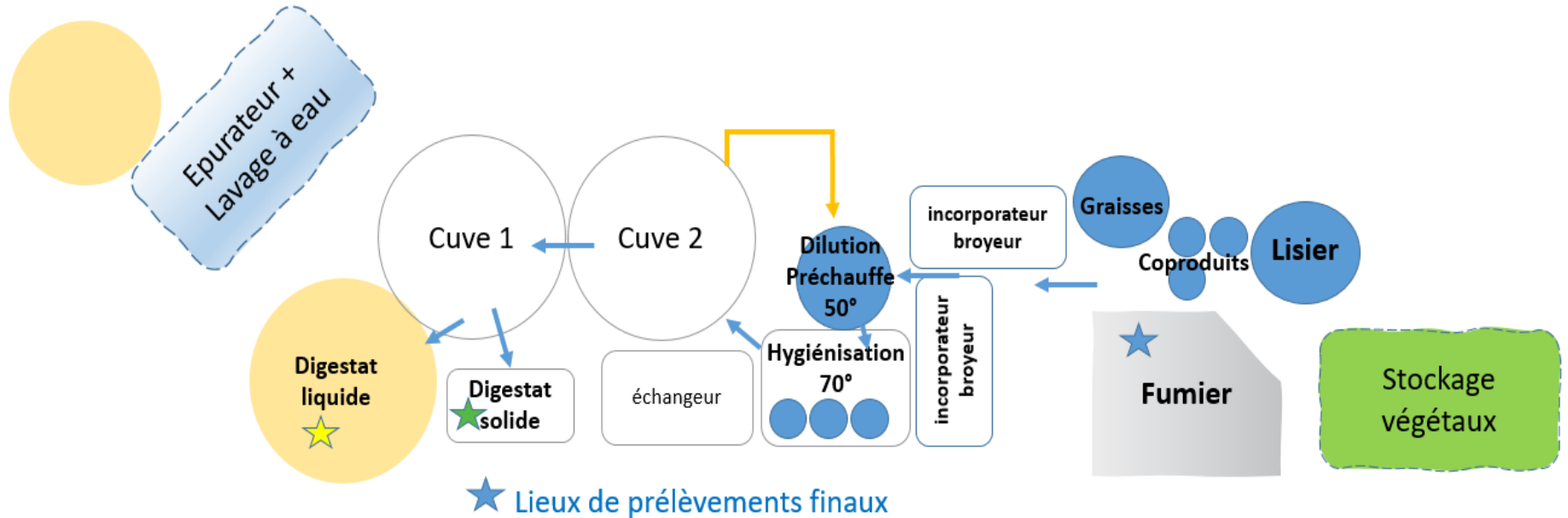
15 à 20% en produits autres

Processus de méthanisation

Méthanisation en flux continu
 Voie humide
Thermophile : 53°C
 Séjour : **55 jours**
Hygiénisation 1h – 70°C

Matrices analysées

Fumier
Digestat liquide
Digestat solide



Quantification de Cb

Intervalle de confiance (Log_{10} copies ICD / g matrice)

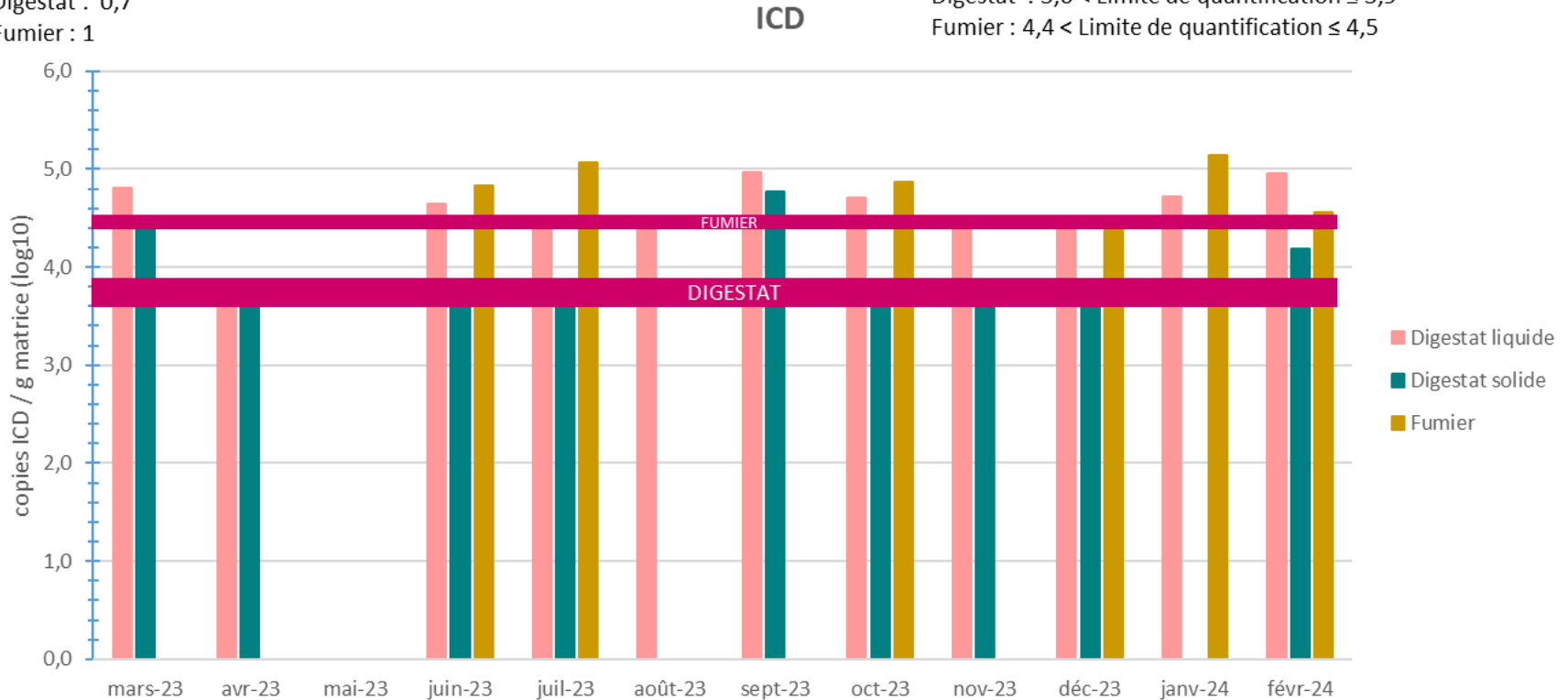
Digestat : 0,7

Fumier : 1

LQ : Limite de quantification (Log_{10} copies ICD / g matrice)

Digestat : $3,6 < \text{Limite de quantification} \leq 3,9$

Fumier : $4,4 < \text{Limite de quantification} \leq 4,5$



DIGESTAT LIQUIDE : Détection positive **11 mois / 12**

DIGESTAT SOLIDE : Détection positive **9 mois / 11**

FUMIER : Détection positive **6 mois / 12**

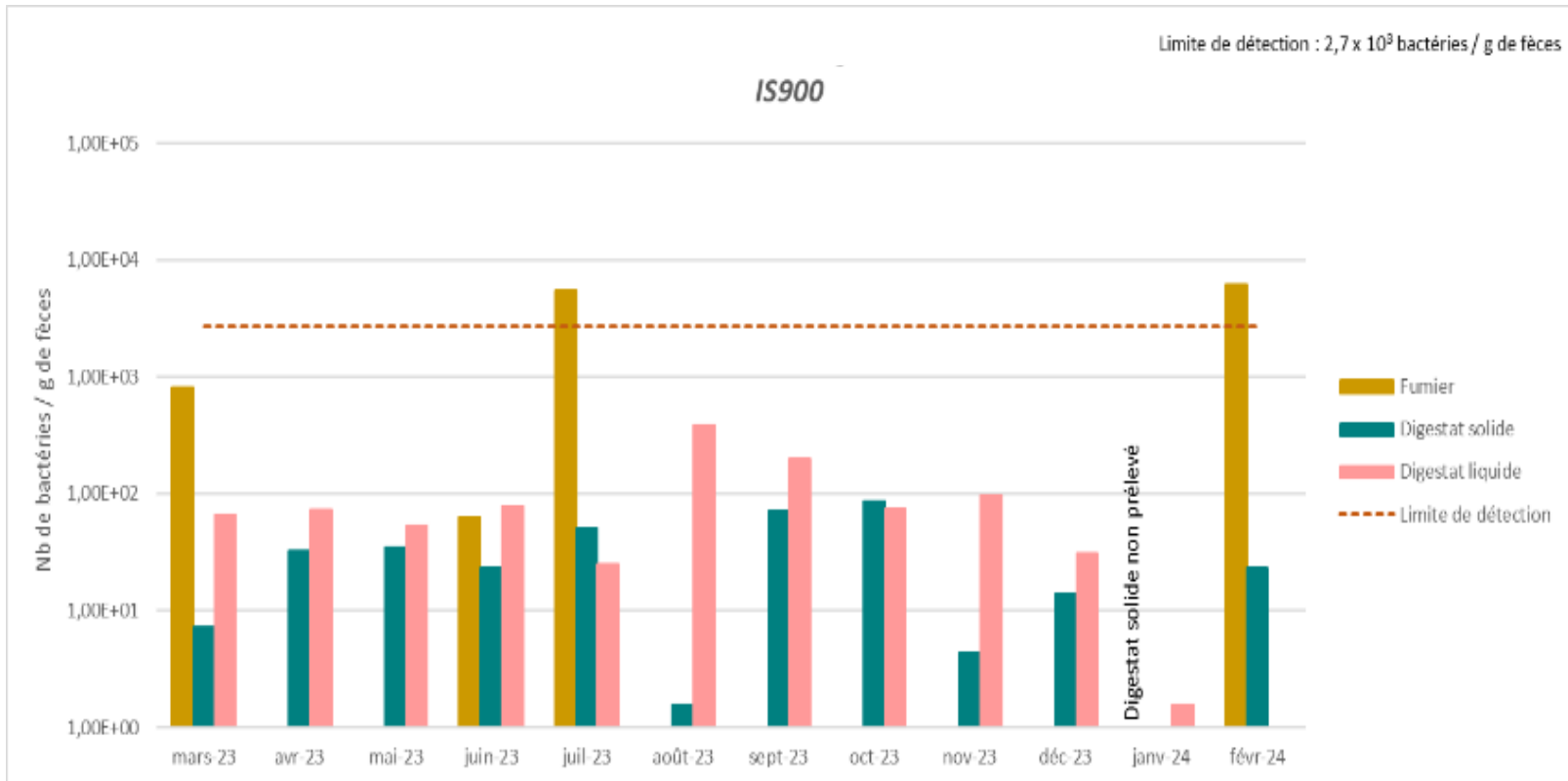
}] Détection récurrente

] Détection intermittente

Niveaux de quantification (pour chaque matrice) → relativement constants

→ à la limite ou supérieurs à la LQ ($\approx 4 \text{ Log}_{10}$)

Quantification de MAP



DIGESTAT LIQUIDE : Détection positive **11 mois / 12**

DIGESTAT SOLIDE : Détection positive **11 mois / 11**

FUMIER : Détection positive **4 mois / 12**

Détection récurrente

Détection intermittente

Niveaux de quantification → faibles

→ inférieurs à la LD

→ LD élevée en raison d'une mauvaise répétabilité et reproductibilité en raison d'inhibiteur ? Comparaison avec la dPCR ?

Conclusions sur le suivi longitudinal

Méthode d'analyse :

L'utilisation de la **PCR digitale** est :

- **Prometteuse** pour la **gestion des inhibiteurs** de PCR **sans dilution** de l'échantillon d'ADN
MAIS ne s'en affranchit pas totalement
- Compatible avec les approches de **multiplexage**, pour la détection de multiples pathogènes en routine pour une gestion plus large des risques sanitaires

Points importants pour la **méthode complète**:

- Combiner la PCR digitale avec des **étapes pré-analytiques optimisées** pour réduire le biais
- Etablir un **profil d'exactitude** pour la méthode complète : important pour la fiabilité des résultats et la **crédibilité scientifique**

Conclusions sur le suivi longitudinal

Données recueillies :

- **Premières données de référence en France** sur la présence des deux pathogènes dans des matrices de méthaniseurs.
- Détection **récurrente** de l'ADN bactérien dans le **digestat liquide**, suggérant :
 - soit une contamination continue par des intrants contenant les bactéries pathogènes
 - soit une persistance de la bactérie via le feed-back qui sert à réensemencer les bactéries méthanogènes
 - soit une persistance de son ADN (petits fragments ciblés amplifiables, sans information sur la viabilité)
- **L'origine des intrants** (élevages de ruminants) semble jouer un rôle dans la détection des pathogènes, **mais d'autres facteurs** (conditions de traitement thermique, structure des matrices), peuvent influencer la persistance des bactéries ou de leur ADN.

Conclusions : Les ADN de Cb et de MAP sont régulièrement détectés dans les digestats, mais ces données exploratoires ne permettent pas **d'évaluer le risque infectieux**



Merci
Responsables de
méthaniseurs



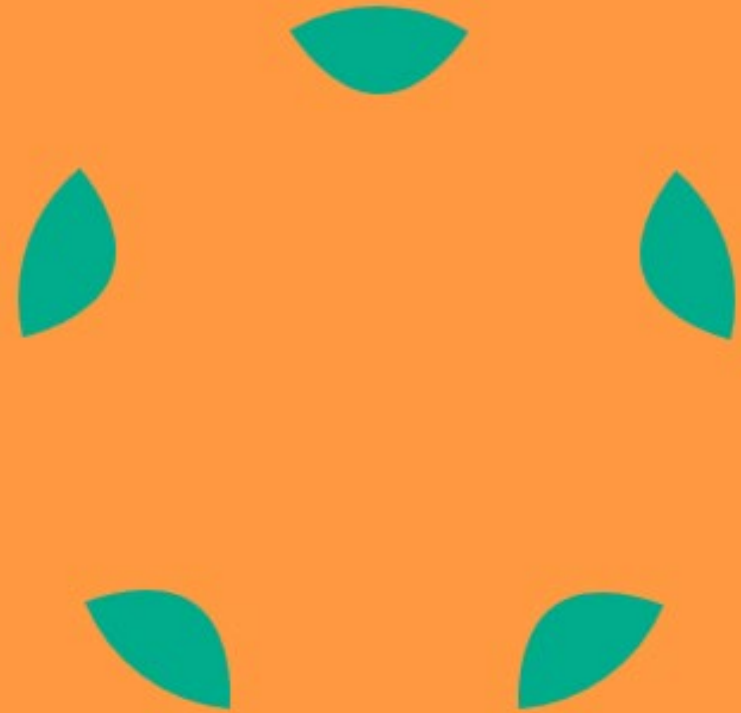
MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE,
DE LA SOUVERAINETÉ
ALIMENTAIRE
ET DE LA FORÊT

Liberté
Égalité
Fraternité

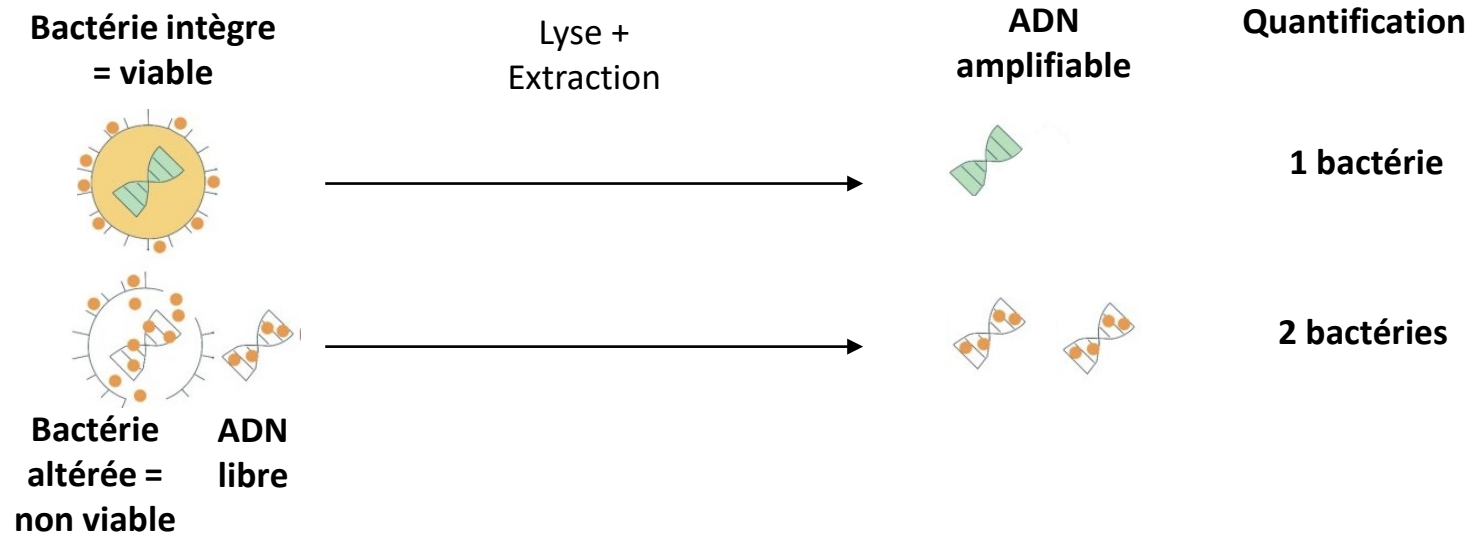


GDS
France

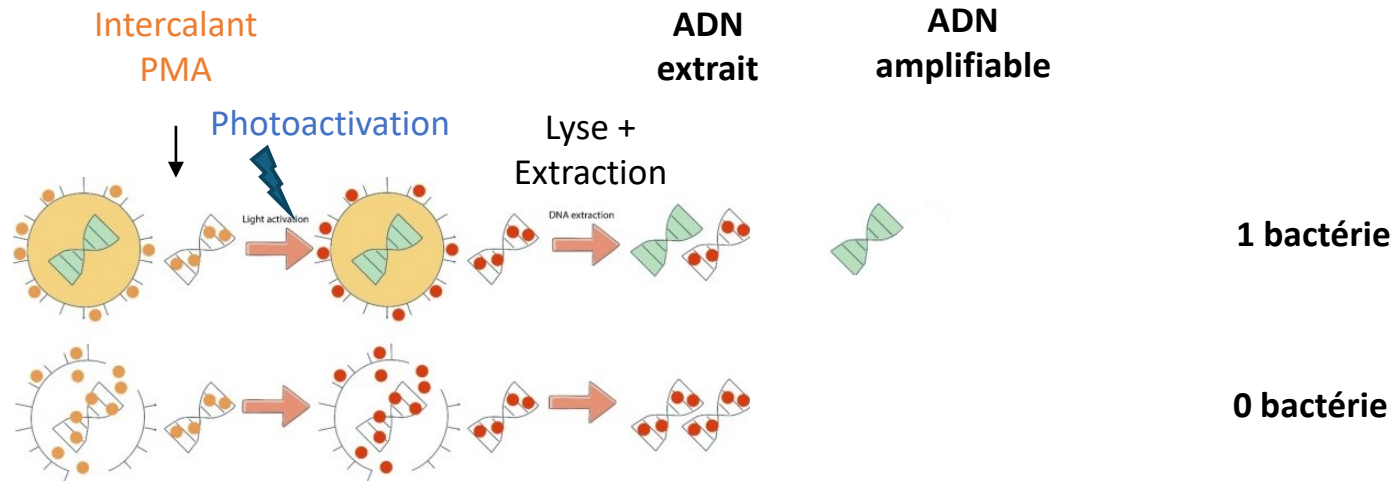
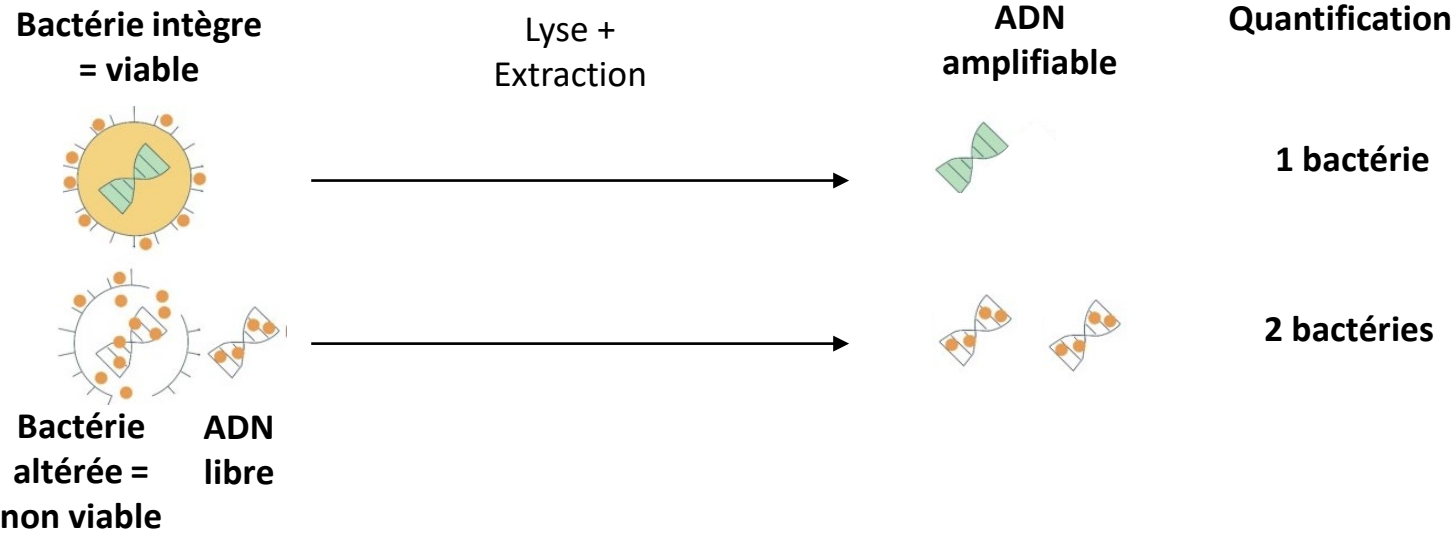
4 — Et la viabilité ?



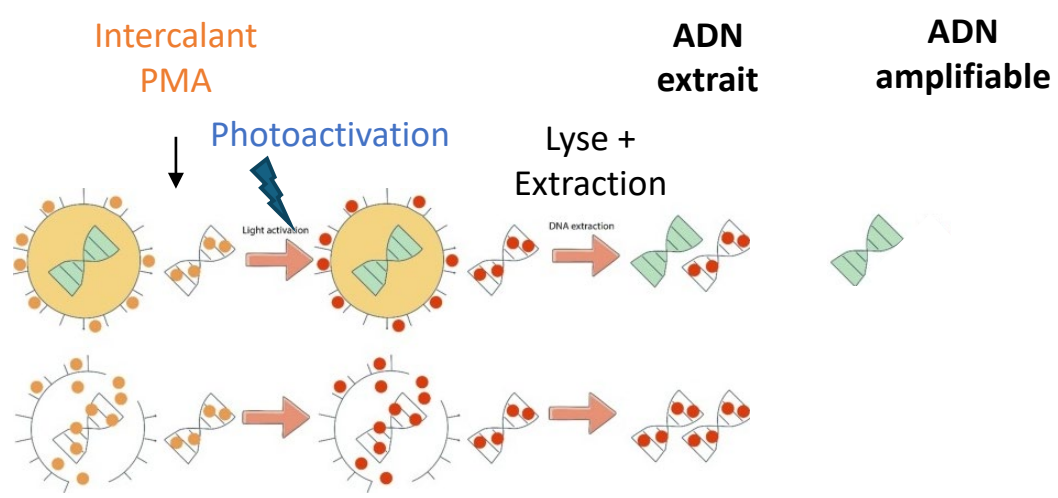
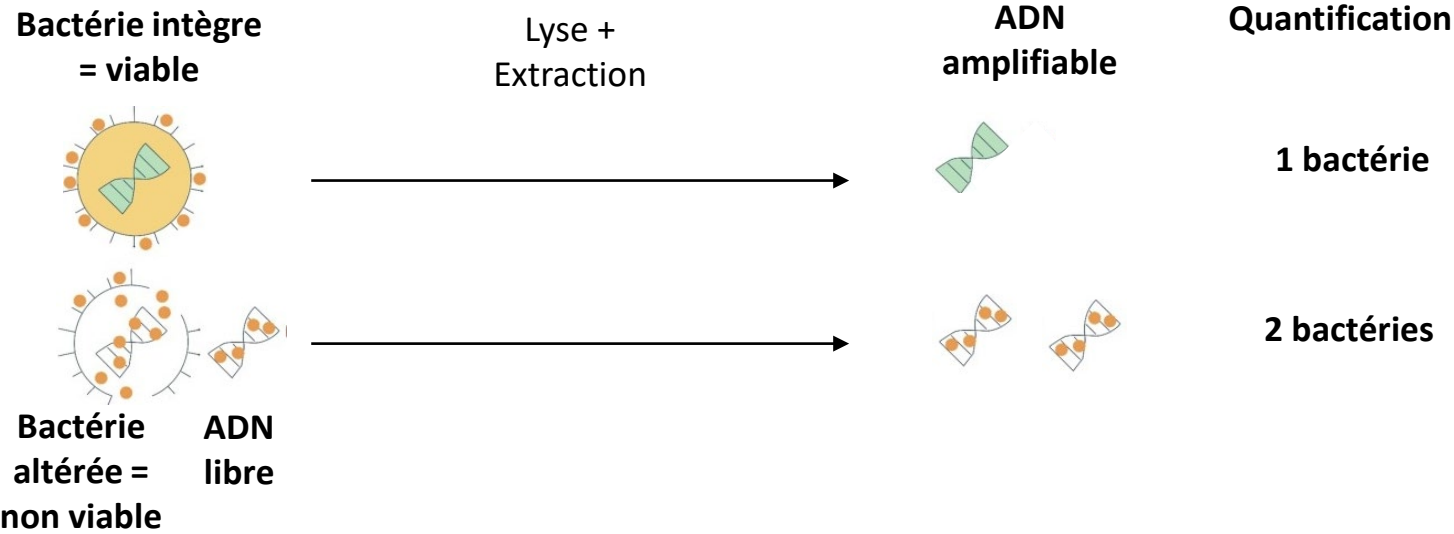
Viabilité et « cultivabilité » des bactéries



Viabilité et « cultivabilité » des bactéries



Viabilité et « cultivabilité » des bactéries

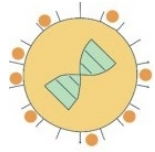


Mise au point nécessaire pour chaque matrice / pathogène

- Concentration / temps d'incubation en PMA
- Temps / type de photoactivation
- Effet matrice : dilution de l'échantillon brut souvent nécessaire
 - > accessibilité du PMA à l'ADN
 - > accessibilité des rayons photoactifs à l'ADN

Viabilité et « cultivabilité » des bactéries

**Bactérie intègre
= viable**



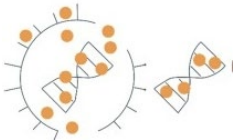
Lyse +
Extraction

**ADN
amplifiable**



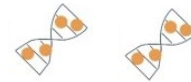
Quantification

1 bactérie



**Bactérie
altérée =
non viable**

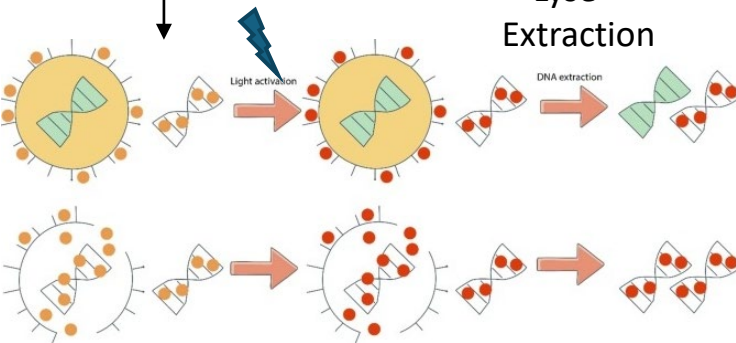
**ADN
libre**



2 bactéries

**Intercalant
PMA**

Photoactivation



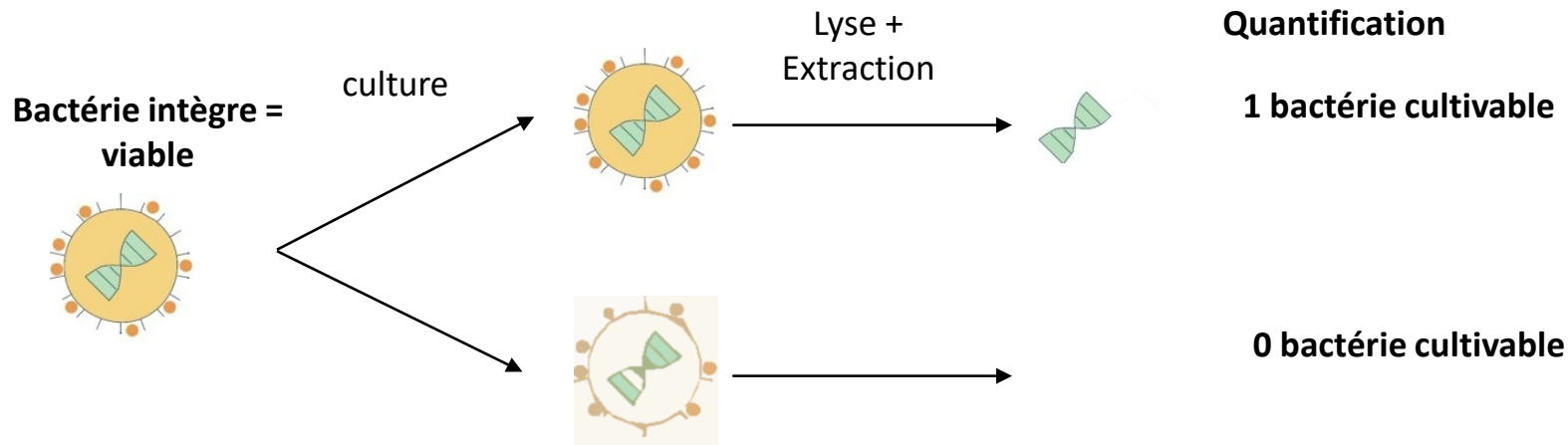
**ADN
extrait**

**ADN
amplifiable**

**Exemple : bactéries lactiques dans des
fèces de porc**

- Concentration en PMA : 100 μ M
- Temps de photoactivation : 15 min
- Effet matrice : dilution de l'échantillon
 - 2 mg de fèces (contre 50 mg dans notre protocole)

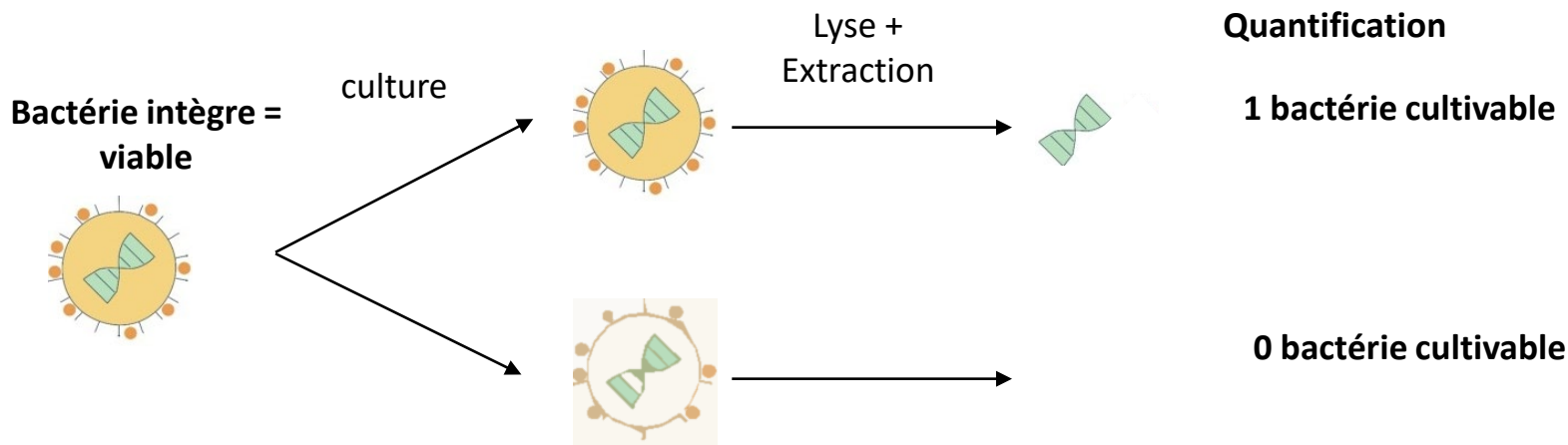
Viabilité et « cultivabilité » des bactéries



Culture de Cb (bactérie intracellulaire) :

- **Modèles animaux** (ex : injection intrapéritonéale dans une souris et collecte de la rate 9 jours après)
- **Modèles cellulaires** (ex : inoculation de tapis cellulaires incubés en 5%CO₂ et collecte plusieurs semaines après)
- **Milieux axéniques** (ex : inoculation de milieu synthétique incubé en 5% CO₂ / 2,5-5% O₂ et collecte une semaine après)

Viabilité et « cultivabilité » des bactéries



Culture de Cb (bactérie intracellulaire) :

- **Modèles animaux** (ex : injection intrapéritonéale dans une souris et collecte de la rate 9 jours après)
 - **Modèles cellulaires** (ex : inoculation de tapis cellulaires incubés en 5%CO₂ et collecte plusieurs semaines après)
 - **Milieus axéniques** (ex : inoculation de milieu synthétique incubé en 5% CO₂ / 2,5-5% O₂ et collecte une semaine après)
- **Nécessité de « nettoyer » le prélèvement pour isoler la souche:**
- Traitements physiques : température, filtration
 - Traitements chimiques : NaOH, ...
 - Traitements antibiotiques

Dans le cas des matrices méthaniseurs:

- Conditions défavorables pour la survie de nombreuses bactéries (pH, anaérobiose, ...) -> moins contaminées que l'intrant?
- Mais ajout de bactéries méthanogènes qui sont:
 - Très petites (0,5 - 1 µm)
 - Anaérobies
 - Résistantes à la chaleur
 - Résistantes aux antibiotiques (pas de peptidoglycane)

-> difficiles à éliminer par les traitements cités précédemment

5 — Annexes



Défis sanitaires

→ Persistance de pathogènes et de gènes de résistance

Identification des **risques sanitaires** liés à l'**épandage du digestat** provenant d'un **méthaniseur collectif**



Retour à l'animal de certains pathogènes



Dissémination des pathogènes entre exploitations



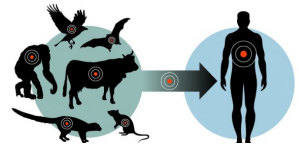
Contamination de la faune sauvage



Contamination des nappes phréatiques



Exposition de la population pour les zoonoses



Objectif : Générer des données scientifiques pour compléter la réglementation sur les **risques sanitaires** liés à l'**épandage de digestat**

→ Besoin d'une méthode d'analyse **robuste** et **fiable**

Caractéristiques des 3 méthaniseurs étudiés humides en flux continu

Méthaniseur 1

Mésophile : 42 °C
Séjour : 75 à 80 jours

50% de fumier : 6 élevages bovins (lait et allaitant) + 1 ovin allaitant + 1 centre équestre

50% autres :

- **Produits végétaux :**
Lisier de porc déshydraté **hygiénisé** + Lisier de certains élevages

Fumier / digestat solide / digestat liquide

Méthaniseur 2

Thermophile : 53°C
Séjour : 55 jours
Hygiénisation 1h – 70°C

60 % de déchets d'origine animale (lisier et déjection solide) – 24 élevages

20 à 25% végétal

15 à 20% en produits autres notamment IAA

Fumier / digestat liquide / digestat solide

Méthaniseur 3

Mésophile
Séjour : 70 à 80 jours

80 à 93 % d'intrants d'origine animale
10 à 50 T Fumier – 5 élevages laitiers

15 à 30 T Lisier – 1 élevage

6 T Déchets de végétaux extérieurs

Fumier / digestat liquide

Processus de méthanisation

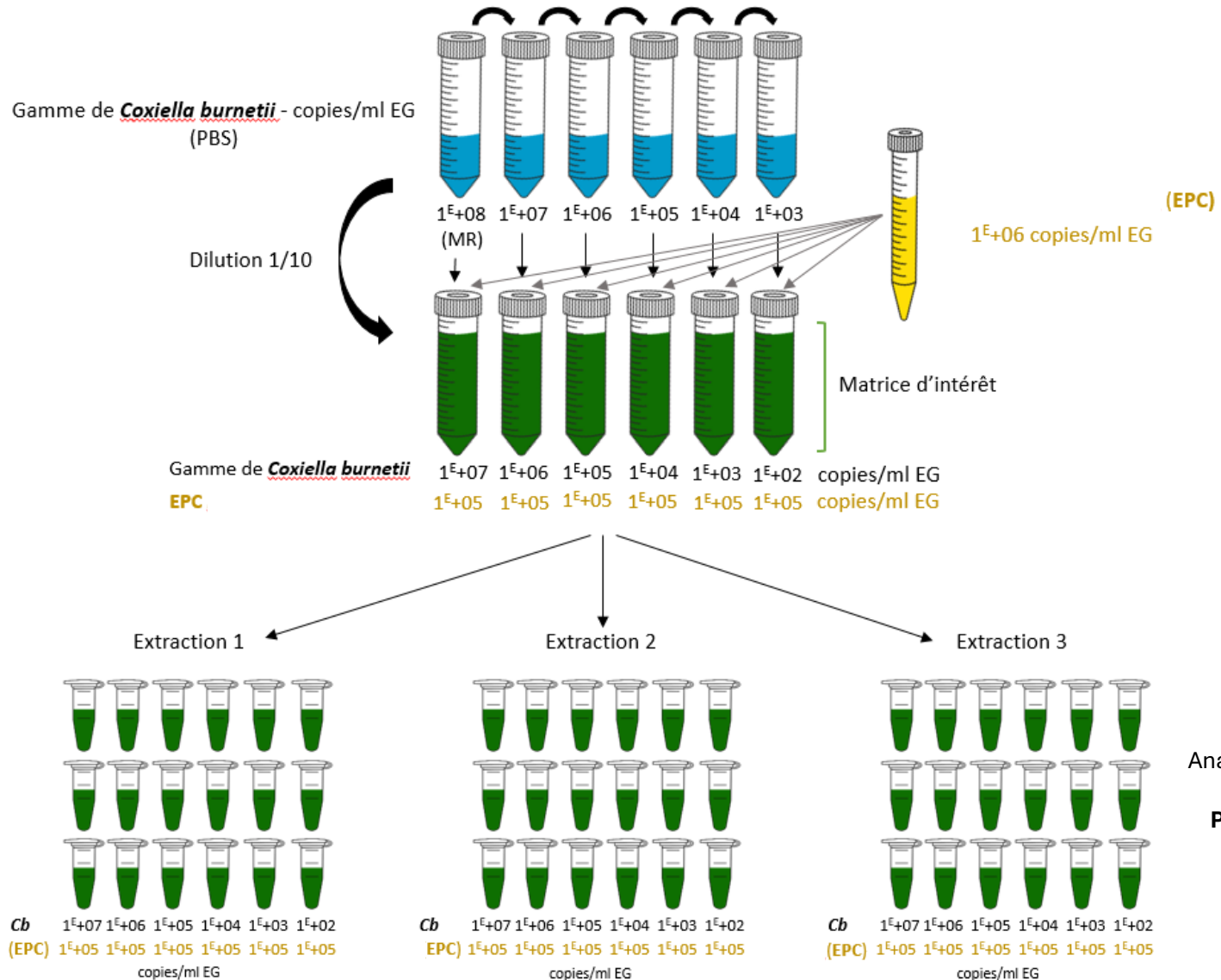
Composition des Intrants

Matrice pour analyse

- Ces 3 méthaniseurs étaient susceptibles de contenir MAP et Cb dans les intrants (effluents ruminants)
- Le **fumier** est la seule matrice d'origine animale commune aux trois méthaniseurs

Validation de méthode complète (Cb)

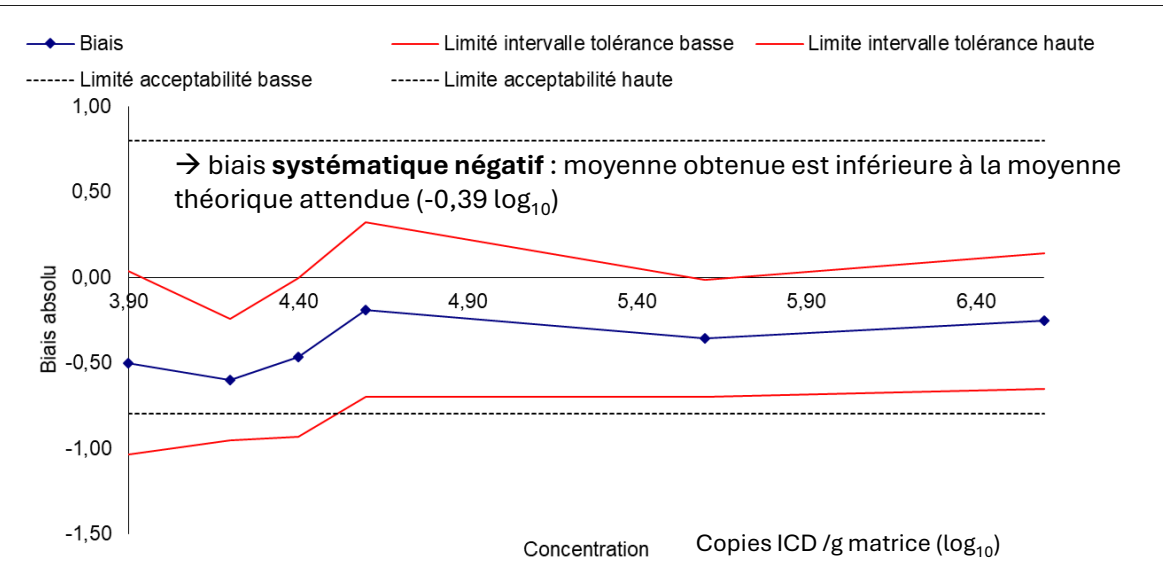
Schéma expérimental pour déterminer les profils d'exactitude et LQ



Résultats : Profil d'exactitude – ICD – Digestat liquide



Profil d'exactitude - ICD (monocopie)



BLEU : justesse (par rapport à la valeur attendue)

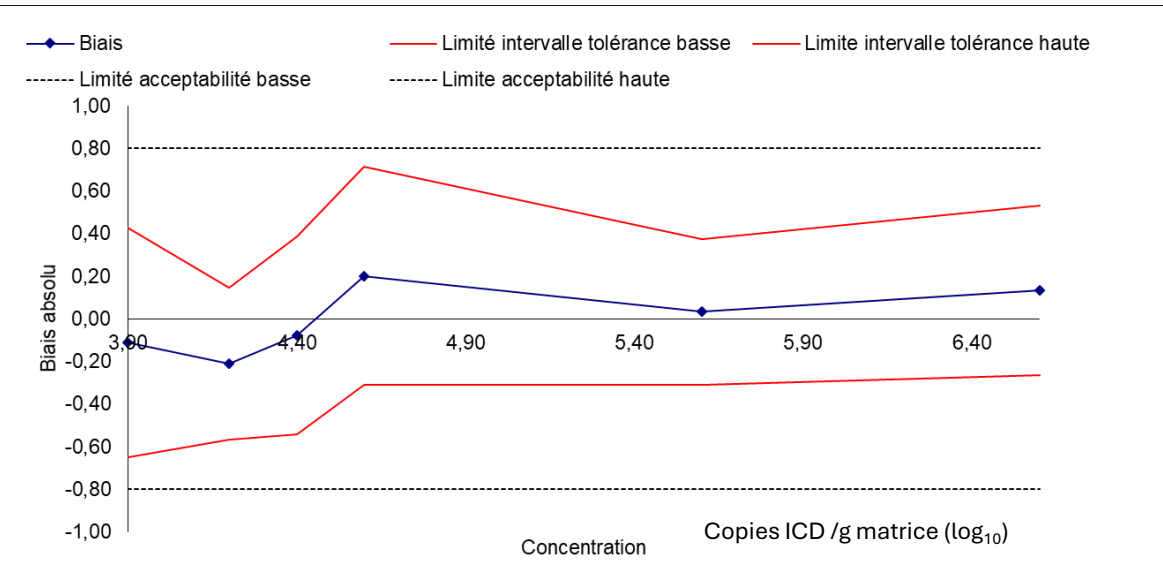
ROUGE : fidélité (intervalle maximale de reproductibilité)

→ correction du **biais** : **0,39 log₁₀**

pour une répartition des valeurs obtenues a plus proche de l'axe des valeurs attendues

→ Intervalle d'acceptabilité : **0,80 log₁₀**

Profil d'exactitude corrigé – ICD (monocopie)



Conclusion

Bonne gestion des inhibiteurs par la dPCR ✓

Efficacité du multiplexage (ICD-IS1111-EPC) ✓

→ tester d'autres méthaniseurs collectifs **avec les méthodes validées** pour élargir les investigations

- **Simuler les conditions de méthanisation** : étudier l'impact des paramètres des méthaniseurs en laboratoire en conditions contrôlées pour clarifier l'effet des températures et des temps de séjour sur la charge bactérienne viable (formes environnementales de *C. burnetii* = « spores », indicateurs biologiques)



@ METYS INRAE TRANSFERT : des réacteurs pilotes ou des dispositifs simulant les environnements anaérobies des méthaniseurs

- **Renforcer les conditions de l'hygiénisation** : étudier des conditions thermiques optimales (ex. 80°C ou pendant une durée plus longue) sur la réduction requise en nombre de log de *C. burnetii* en paramètres contrôlées.
- **Réaliser des tests sur les autres intrants** : déterminer la contribution potentielle des intrants autres que les fumiers sur la charge bactérienne globale dans les méthaniseurs.