

PATHO-RMQS : Répartition géographique des bactéries pathogènes de l'Homme dans les sols : effet des constituants et de l'urbanisation

Sylvie Nazaret, Equipe Bactéries Pathogènes Opportunistes et Environnement, CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, et Université Lyon 1, UMR 5557 Ecologie Microbienne, 69622 Villeurbanne. sylvie.nazaret@univ-lyon1.fr

Alain Hartmann, INRA - Université Bourgogne, UMR 1229 Microbiologie du Sol et de l'Environnement, 17 rue de Sully, BP 86510, 21065 Dijon. alain.hartmann@dijon.inra.fr

Claudy Jolivet, INRA, Unité InfoSol, 2163 Avenue de la Pomme de Pin, 45075 Orléans. claudy.jolivet@orleans.inra.fr

Jean Thioulouse, CNRS, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, et Université Lyon 1, UMR 5558 Biométrie et Biologie Evolutive, 69622 Villeurbanne. jean.thioulouse@univ-lyon1.fr

Lionel Ranjard, INRA - Université Bourgogne, UMR 1229 Microbiologie du Sol et de l'Environnement / Plateforme Genosol, 17 rue de Sully, BP 86510, 21065 Dijon. lionel.ranjard@dijon.inra.fr

Jérôme Briolay, CNRS, Université Lyon 1, Plateforme du DTAMB, 69622 Villeurbanne. jerome.briolay@univ-lyon1.fr

1. Objectifs et situation du sujet :

Le projet Patho-RMQS intègre le champ thématique "santé-environnement" et concerne l'écologie des agents bactériens infectieux. Ce projet a pour objectifs d'étudier la distribution de différents pathogènes humains dans les sols français *via* une stratégie d'échantillonnage portant sur l'ensemble du territoire français métropolitain et de comprendre l'influence des facteurs abiotiques (facteurs climatiques, caractéristiques physico-chimiques, source de contamination, fertilisation ...) et biotiques (densité et structure génétique des communautés bactériennes indigènes) sur la survie et la dispersion de ces pathogènes. A l'interface entre nature et société, assurant des fonctions de production alimentaire et des fonctions environnementales essentielles à la vie humaine, le sol est un environnement soumis à de multiples contraintes qui ne peuvent pas être sans répercussions sur la dynamique des agents infectieux. Par ailleurs, ce milieu vivant héberge une microflore bactérienne abondante et d'une grande diversité et offre par sa complexité structurale et physico-chimique une multiplicité d'habitats. A ce jour les données disponibles sont encore trop fragmentées et insuffisantes pour bien appréhender la distribution des agents infectieux bactériens dans l'environnement, et notamment dans les sols. Par ailleurs les conditions d'étude ne sont pas nécessairement le reflet de la réalité car elles impliquent très souvent l'utilisation d'un inoculum bactérien dont les critères quantitatifs et physiologiques ne correspondent pas à une source naturelle. De même trop peu de facteurs environnementaux dont l'influence est appréhendée dans des conditions simplifiées sont pris en compte.

2. Matériels et méthodes

2.1. Sites étudiés et stratégie d'échantillonnage des sols

Le projet Patho-RMQS s'appuie sur deux réseaux nationaux, le RMQS (Réseau de Mesures de la Qualité des Sols) et l'ICP-Forest niveau 1, et sur une stratégie d'échantillonnage portant sur l'ensemble du territoire métropolitain (échantillonnage exhaustif, standardisé, représentatif de différents types et modes d'exploitation du sol). Les sols se répartissent sur 2200 sites de surveillance (1600 sites agricoles et 600 sites forestiers) de la qualité des sols mis en place sur le territoire métropolitain selon une grille systématique de maille carrée de 16 km de côté. Ils couvrent les principales combinaisons sol – occupation et les principaux types de sol rencontrés en France. Les échantillons prélevés dans la couche de surface (0-30 cm) et la couche sous-jacente (30-50 cm) sont préparés selon les normes AFNOR ou ISO au sein de l'Unité InfoSol de l'INRA d'Orléans et conservés dans la pédothèque, sous conditions contrôlées d'hygrométrie et de température, du Conservatoire National des échantillons de sol. Dans le le projet Patho-RMQS l'étude a porté sur 1400

sols. La stratégie retenue pour les sélectionner a été : échantillonnage sur l'ensemble du territoire selon la grille de 16x16 en prélevant en quinconce et échantillonnage complet selon la grille de 16x16 sur 6 zones (zone Nord : 104 sites; zone Bretagne: 156 sites ; zone Bassin Parisien : 157 sites; zone Centre: 170 sites; zone Landes : 54 sites; zone Alpes: 125 sites).

2.2. Microorganismes ciblés

Nous nous sommes intéressés à différents modèles bactériens, certains étant des pathogènes "primaires" ou des commensaux (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Burkholderia pseudomallei*) et d'autres étant des pathogènes opportunistes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Nocardia farcinica* et *Nocardia cyrillipe*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*). Ces espèces bactériennes se différencient également par leur distribution présumée dans l'environnement. Certaines sont décrites dans la littérature comme associées à des environnements aquatiques (*A. hydrophila*, *P. aeruginosa*), ou animal/humain (*E. coli*, *S. aureus*) alors que d'autres ont essentiellement été isolées des sols et de la rhizosphère (*B. cenocepacia*, *S. maltophilia*).

2.3. Détection par l'isolement et la culture

Des stratégies d'isolement sur milieu de culture sélectif couplés ou non à des étapes d'enrichissement et d'identification génotypiques sont menés en parallèle afin de comparer les limites de détection de l'approche de PCR quantitative en temps réel et de disposer de collection de souches environnementales qui permettront ultérieurement de comparer les propriétés des souches cliniques à celles des souches environnementales.

2.4. Développement d'une méthode de détection indépendante de la culture : la PCR quantitative en temps réel

Un outil moléculaire indépendant de la culture (la PCR quantitative en temps réel ciblant des marqueurs spécifiques d'espèce) a été développé et optimisé pour détecter et quantifier ces pathogènes sur des ADN extraits des sols. Cette approche ne reposant pas sur la culture permet de limiter les biais liés à l'état viable non cultivable des cellules et à la semi-sélectivité des milieux (le sol renferme une telle diversité d'espèce que les milieux sélectifs développés pour l'utilisation en milieu hospitalier ne garantissent pas la croissance exclusive de l'organisme ciblé). La PCR en temps réel permet de suivre au cours de chaque cycle d'amplification la production de fragments d'ADN cible via une production de fluorescence permettant une détection plus sensible et plus fiable du nombre de cellules présentes dans un échantillon. Des outils de statistique descriptive (analyses multivariées) sont appliqués afin d'identifier les facteurs environnementaux déterminant la distribution de ces pathogènes.

2.5. Etude de survie en microcosmes

Des expérimentations en microcosmes de sol ont été réalisées afin d'évaluer l'influence de caractéristiques abiotiques sur la survie des pathogènes dans les sols. La survie a été suivie sur une centaine de sols sur une période de 2 mois. Les cellules ont été inoculées à une dose de 10^6 UFC par g de sol.

3. Résultats

Une grande partie des résultats obtenus est d'ordre méthodologique et concerne la mise au point de marqueurs génétiques d'espèces, l'optimisation de la PCR en temps réel pour son application sur des échantillons d'ADN extraits du sol et l'évaluation des biais et limites de l'outil. La lourdeur des mises au point et les multiples difficultés rencontrées pour le développement et/ou la validation de ces marqueurs ont été des facteurs limitants ne permettant pas *in fine* l'obtention de marqueurs pour

l'ensemble des pathogènes que nous proposons d'étudier, ni le traitement de l'ensemble des ADN du RMQS.

3.1. Optimisation des marqueurs d'espèces

Alors que nous pensions utiliser dans la plupart des cas les marqueurs génétiques déjà décrits dans la littérature, tous les marqueurs ne se sont pas révélés efficaces pour une application sur des ADN de sol. En effet, les marqueurs existants ne répondent pas nécessairement à nos attentes car les motivations (i.e. élaboration d'un outil de diagnostic) à l'origine de leur développement et le type d'échantillons et d'environnements étudiés (échantillon clinique, échantillon alimentaire,...) n'imposent pas le même niveau de contraintes que les échantillons de sols. Ainsi très souvent des gènes phylogénétiques tels que ceux de l'opéron ribosomique sont utilisés. Or ces gènes s'ils sont performants pour le traitement d'échantillons cliniques présentent du fait de leur universalité et de leur grande conservation de séquences le risque d'un manque de spécificité pour être appliqués à l'étude du milieu sol. La présence dans les sols d'une grande diversité d'espèces augmente le risque de détection d'espèces phylogénétiquement proches des pathogènes ciblés. Similairement l'utilisation des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques ou impliqués dans les propriétés de virulence nécessite de s'assurer que ces gènes sont distribués largement au sein de l'espèce ou qu'ils différencient très nettement les souches pathogènes des souches non pathogènes. A l'issue de ce projet nous avons cependant pu mettre au point et valider les marqueurs génétiques spécifiques d'espèces pour *P. aeruginosa* (*ecfX*), *A. baumannii* (intergène 16S-23S), *S. maltophilia* (*smeD*), *L. monocytogenes* (*prs*), *E. faecalis* (*ecfX*), *E. coli* (*uidA*), *S. enterica* (*invA*) et les 2 espèces d'*Aeromonas* (*tpmY*). Nous avons par ailleurs validé un couple d'amorces ciblant le gène codant l'ARNr16S pour l'ensemble du genre *Acinetobacter*, ainsi que des couples ciblant les espèces *Nocardia cyriacigeorgica* et *N. farcinica* (gènes de fonction inconnue) et les 2/3 des espèces du genre *Nocardia* (gène *sod*).

3.2. Détection *in situ* des pathogènes : limites et biais de la PCR quantitative en temps réel comparé à l'approche dépendante de la culture

L'avantage d'un outil tel que la qPCR est d'une part sa sensibilité de détection et d'autre part la possibilité de traiter rapidement un grand nombre d'échantillons dans des conditions standardisées grâce à des robots semi-préparatifs et à des appareils PCR adaptés pour le moyen/haut-débit. Cependant nos essais ont confirmé que la haute sensibilité de cet outil, détection d'une copie par réaction PCR dans une gamme étalon d'ADN de souche pure, est fortement réduite lorsque l'ADN est extrait d'une matrice aussi complexe, tant sur le plan de la diversité biologique que la diversité physico-chimique, que l'est le sol. L'efficacité de la détection d'une espèce bactérienne dans un échantillon environnemental est conditionnée par l'efficacité de la méthode d'extraction et de purification de l'ADN, par l'efficacité des enzymes et des conditions expérimentales (kit de réactions, machines, logiciels de traitements des données) imposées par les fabricants et par la nature des marqueurs génétiques choisis (couples d'amorces, pourcentage GC des cibles,...). Une partie de notre travail expérimental a donc consisté à optimiser l'efficacité et la sensibilité de la PCR en temps réel pour son application à des extraits d'ADN de sol, afin *in fine* d'évaluer et optimiser la performance de chaque marqueur d'espèce. L'extraction des acides nucléiques du sol est une étape délicate et malgré l'amélioration des méthodes, des inhibiteurs sont souvent co-extraits en même temps que les acides nucléiques. Ces inhibiteurs peuvent limiter, par la suite, l'action de la *Taq* polymérase lors de la phase d'élongation de la PCR en temps réel et engendrer une sous-estimation de la quantification. Afin de s'assurer que l'inhibition est inexistante, un test a été mis au point. Il consiste à ajouter à chacun des échantillons d'ADN des sols du RMQS, une quantité connue de gènes cibles (plasmide pGEMT), servant de matrice pour la PCR en temps réel. En parallèle, le gène cible seul et en quantité connue est quantifié de la même manière. La comparaison des résultats permet la détection d'une éventuelle inhibition provenant d'un taux élevé d'inhibiteur dans les extractions d'ADN. Ce test appliqué à 1463 sols a permis de mettre en évidence que 94% des ADN ne présentaient pas ou peu de pouvoir inhibiteur, que 4% présentaient un pouvoir inhibiteur allant jusqu'à 10% et que 2% présentaient un pouvoir inhibiteur total. Aucun lien n'a cependant pu être établi entre ce pouvoir inhibiteur et les

caractéristiques abiotiques des sols. Par ailleurs des tests d'inoculation de souches, représentant différentes espèces de pathogènes, dans différents types de sol ont été réalisés en microcosmes afin de rendre compte de l'efficacité de la méthode d'extraction d'ADN et de la sensibilité des marqueurs d'espèces. Cet essai a permis de confirmer que le niveau de détection d'une espèce dans un sol est de l'ordre de 10^4 GE (génomome équivalent) par g de sol. Il est cependant permis d'espérer que ces verrous méthodologiques puissent être levés et que le seuil de détection soit fortement abaissé. Ainsi des publications récentes font état de l'existence d'enzymes de type *Taq* polymérase beaucoup moins sensibles aux inhibiteurs présents dans les extraits d'ADN. Un abaissement de plusieurs log du seuil de détection devrait pouvoir être aisément atteint. A titre comparatif nous avons mis en évidence que l'approche de culture sur milieu sélectif, lorsque celui-ci existe, permet de détecter une espèce à un seuil de 10^2 (cas de *P. aeruginosa*) à 10^5 (cas d'*A. baumannii*) cellules /g de sol selon la sélectivité du milieu. Dans le cas où une procédure d'enrichissement peut être utilisée (*Listeria*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Burkholderia*) ce seuil de détection est abaissé à quelques cellules par g de sol, cependant l'information demeure purement qualitative (présence/ absence).

3.3. Le sol réservoir ou réceptacle des espèces pathogènes

Le criblage de la totalité ou d'une partie des sols du RMQS avec les outils disponibles a été réalisé, en duplicat ou triplicat, pour 9 espèces de pathogènes (e.g. détection de *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, et *S. enterica* par le partenaire 2 et *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cenocepacia*, *N. cyriacigeorgica* et *A. baumannii* par le partenaire 1). L'ensemble des résultats obtenus permet de conclure à la présence d'*E. faecalis* et de *S. enterica* dans seulement 4,3% et 1,4% des sols et à l'absence totale de détection de *L. monocytogenes*, dans les 1463 échantillons d'ADN du dispositif RMQS. Similairement l'espèce *A. baumannii* n'a été que très rarement détectée (6 sur 1160 ADN criblés) alors que le genre *Acinetobacter* a été retrouvé dans 112 sols à des niveaux compris pour la plupart entre 10^5 et 10^6 GE par g de sol sec (Figure1). La confrontation des données de prévalence du genre *Acinetobacter* aux caractéristiques des sols a permis d'établir une prévalence influencée par le pH et le mode d'occupation des sols.

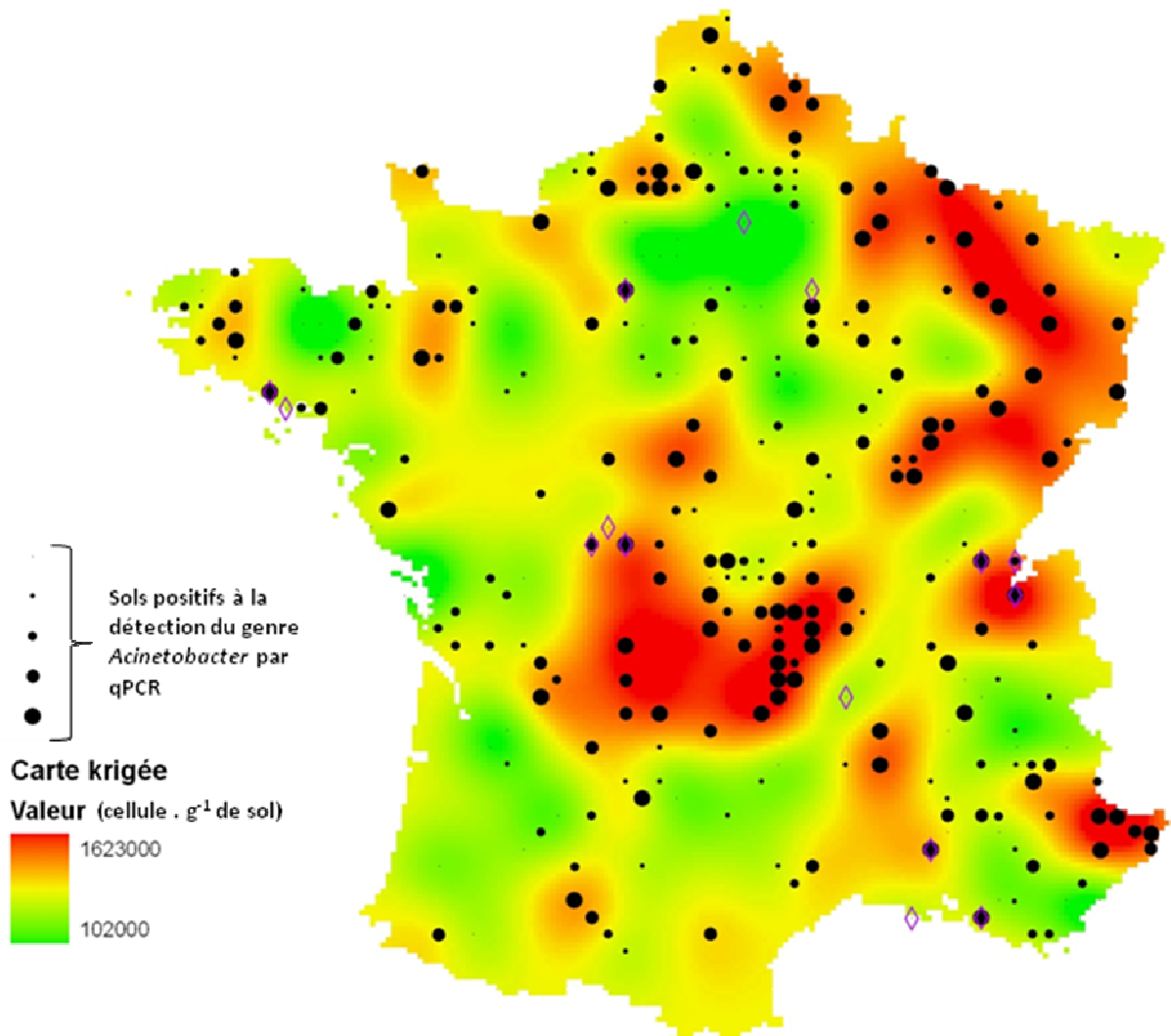


Figure 1 : Répartition spatiale du genre *Acinetobacter* dans les sols français.

Dans le cas de l'espèce *E. coli*, le crible d'environ 1000 ADN a permis de mettre en évidence par ACP une corrélation significative entre la détection par PCR en temps réel de cette espèce et un certain nombre de paramètres physico-chimiques des sols. L'abondance d'*E. coli* (de 0 à 5×10^5 GE par g de sol) est corrélée positivement au pH, à la teneur en argile et limons, à la présence de calcium échangeable et à un rapport C/N faible. L'espèce *E. coli* semble donc plus fréquemment détectée lorsque l'azote est plus disponible dans les sols. Bien qu'ayant été testée sur un plus faible nombre d'échantillons (360 ADN) la PCR en temps réel n'a pas permis de détecter les espèces *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* et *N. cyriacigeorgica* dans les sols. Elle a cependant permis de détecter dans certains sols la présence de *S. maltophilia* à des niveaux voisinant la limite de détection de l'outil.

Cette absence ou présence de chaque espèce évaluée par PCR quantitative a été confirmée par l'approche de détection basée sur la culture sur milieu sélectif couplé à la confirmation de l'identité des colonies. Ainsi l'analyse de 57 sols du RMQS choisis dans la région Bourgogne (32 sols) et en Corse (25 sols) a permis de confirmer l'absence de détection de l'espèce *B. cenocepacia*, *A. baumannii* et *S. enterica* (malgré la présence de colonies apparentées aux genres *Burkholderia* et *Acinetobacter*), la très rare présence de *P. aeruginosa* et *L. monocytogenes* (1 à 2 échantillons) et la fréquente présence des espèces *S. maltophilia* et *E. faecalis* (50% des échantillons à un niveau inférieur à 10^4 cellules/g de sol) et d'*E. coli* (75% des échantillons à des niveaux nécessitant des étapes d'enrichissement). Le trop faible nombre d'échantillons criblés par cette approche de culture n'a pas permis de mettre en

évidence de lien entre la présence de *S. maltophilia* ou d'*E. coli* et les caractéristiques abiotiques et biotiques des sols.

3.4. Influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la distribution des pathogènes

Une souche de *L. monocytogenes* EGDe résistante à la rifampicine a été inoculée dans des microcosmes de sol réhydraté et la survie a été suivie sur une période de 2 mois. A l'issue de cette expérimentation les sols peuvent être classés en 3 groupes : i) sols où *L. monocytogenes* persiste à un niveau de 10⁴ UFC à l'issue de l'incubation avec une décroissance lente, ii) sols où après seulement 7 jours d'incubation *L. monocytogenes* n'est plus détectable (sols acides et riches en sable), iii) sols pour lesquels *L. monocytogenes* présente un comportement intermédiaire et est encore détectable à faible niveau après 2 mois d'incubation. L'analyse en composantes principales montre que les paramètres principaux influençant la survie de *L. monocytogenes* sont le pH, les teneurs en argile et sable, et la CEC (capacité d'échange de cations). Ces facteurs sont cependant des caractères influençant de manière générale la distribution des espèces bactériennes comme déjà décrit dans la littérature (cas des études menées sur la structure des communautés microbiennes dans les sols ; exemple du projet ECOMIC-RMQS de l'ANR Biodiversité). Les expériences de survie se poursuivent en utilisant 3 autres modèles bactériens (*E. faecalis*, *E. coli*, *S. enterica*), afin de déterminer le caractère générique (ou non) des résultats obtenus pour *L. monocytogenes*.

4. Les principales publications obtenues

Colinon C, Deredjian A, Youenou B, Dequiedt S, Jolivet C, Lelièvre M, Ranjard L, Saby N, Hartmann A, and Nazaret S. A large-scale test with real-time quantitative PCR to examine the distribution of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* in french agricultural soils. Refusé dans FEMS Microbiology Ecology (édition spéciale BAGECO 2009). Soumis Applied Environmental Microbiology

Deredjian A, Colinon C, Brothier B, Youenou B, Cournoyer B, Dequiedt S, Hartmann A, Henry S, Hien E, Houot S, Ranjard L, Saby N, and Nazaret S. Culture dependent approach and real time PCR for an extensive survey of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural soils and to evaluate the influence of organic amendment. Soumis FEMS Microbial Ecology

Conférences internationales :

Locatelli A., Ranjard L., Dequiedt S., Jolivet C., Depret G., Hartmann A. (2010). Prevalence of several human bacterial pathogens in French soils. In "13th International Symposium on Microbial Ecology ISME 13". Seattle, USA, 22-27 août 2010. Poster.

Deredjian A, Colinon C, Amane M, Bouziri Kemayel L, Favre-Bonté S, Hien E, Jolivet C, Lata JC, Ranjard L, Thioulouse J, and Nazaret S. Soils as reservoir of opportunistic human bacterial pathogens and impact of agricultural practices. Meeting on « Ecology of soil microorganism », Prague, Avril 2011. Conférence orale.

Conférences nationales :

Henry S, Colinon C, Favre-Bonté S, Brothier E, Briolay J, Ranjard L, Cournoyer B, Hartmann A, Jolivet C, et Nazaret S. Distribution de bactéries pathogènes dans les sols évaluée par PCR quantitative en temps réel. Colloque AFEM, Lyon - Septembre 2009. Poster.

5. Les faits marquants, les retombées prévisibles et les perspectives de valorisation (y compris sociale, économique.....).

Les points forts de ce projet sont le développement de marqueurs génétiques spécifiques de différentes espèces bactériennes pathogènes de l'homme et leur validation pour le suivi d'espèce dans

un environnement complexe. Ces outils sont d'intérêt tant dans le domaine clinique que dans celui du développement de bioindicateurs et la mise au point de normes pour rendre compte de l'impact environnemental de diverses pratiques agronomiques. Nous disposons également pour une dizaine d'espèces d'un instantané de leur distribution dans l'environnement sol à grande échelle à savoir une échelle nationale, échelle rarement explorée. Les dispositifs RMQS et ICP-Forest niveau 1 (ICP-Forest) sur lesquels s'appuie ce projet étant mis en place pour permettre plusieurs campagnes d'échantillonnage (mesures effectuées tous les 10 ans) cette distribution des pathogènes pourrait être évaluée sur le long terme. Ce projet a également permis d'étoffer les collections d'espèces pathogènes en y ajoutant un grand nombre d'isolats environnementaux, isolats qui pourront être utilisés et diffusés par les centres de référence sur certains agents pathogènes (plateau PARMIC-CRB de l'Equipex Biobanque). Ces collections d'isolats servent entre autres de support pour mener des études sur la distribution et l'analyse comparées des mécanismes de résistance aux antibiotiques au sein des populations cliniques *versus* leur distribution au sein des populations environnementales. De façon plus générale elles contribueront à développer des études visant à mieux comprendre le rôle originel de ces mécanismes et évaluer l'impact de l'usage des antibiotiques par l'homme dans le détournement de ces fonctions.