

Densités des mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) dans les sols, l'eau de surface et l'eau usée, et discussion sur la surveillance des microorganismes pathogènes dans l'environnement

Nicolas Radomski¹, Françoise Lucas^{2*}, Emmanuelle Cambau³, Laurent Moulin⁴,
Sophie Haenn⁴, Moilleron Régis²

¹ *Leesu UMR MA 102, Ecole des Ponts ParisTech, Université Paris Est, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, 77455 Champs sur marne :*
nicolas.radomski@leesu.enpc.fr

² *Leesu UMR MA 102, Université Paris Est, 61 avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil :*
moilleron@univ-paris12.fr, lucas@univ-paris12.fr

³ *Laboratoire associé du Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux, Laboratoire de bactériologie, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris :*
emmanuelle.cambau@sls.aphp.fr

⁴ *Eau de Paris, Direction Recherche Développement Qualité Eau, 33 avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry sur Seine :*
laurent.moulin@eaudeparis.fr, sophie.haenn@eaudeparis.fr

* *Personne à contacter,* lucas@univ-paris12.fr

1 Introduction

Suite aux développements analytiques présentés dans les rapports d'avancement 2008 (Rapport action MNT 2008) et 2009 (Rapport action MNT 2009), publiés sous forme de deux articles en bactériologie (11) et biologie moléculaire (12) dans Applied and Environmental Microbiology, il a été entrepris de comparer les méthodes d'extraction d'ADN mycobactérien dans des échantillons environnementaux et d'appliquer la méthode la plus adaptée pour quantifier les mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) dans les échantillons collectés en 2008, 2009 et 2010 (Rapports action MNT 2008 et 2009). Plus précisément, l'état de l'art sur les sources environnementales de MNT (Rapports action MNT 2008 et 2009) nous a indiqué que les densités de MNT dans les sols et dans les eaux de surface pendant des événements pluvieux sont très peu étudiées. Nous avons donc exploré ces sources diffuses potentielles en échantillonnant des sols urbains, péri-urbains et ruraux, ainsi que l'impact de plusieurs affluents sur la qualité de la Marne en temps sec et lors d'un événement pluvieux. Il est donc présenté dans ce rapport la comparaison des méthodes d'extraction d'ADN mycobactérien, la caractérisation de la nature des sols propices à la présence de forte concentration en mycobactéries et l'étude de l'impact sur l'eau de surface des ruissellements en temps de pluie.

2 Méthode efficace d'extraction d'ADN mycobactérien d'échantillons environnementaux

La méthode d'extraction d'ADN a été optimisée en vue de quantifier les MNT par PCR en temps réel dans les échantillons d'eau de surface. L'objectif était de déterminer la méthode d'extraction d'ADN permettant de récupérer le plus d'ADN mycobactérien, tout en éliminant les inhibiteurs de PCR de la matrice environnementale. Nous avons donc comparé différentes combinaisons de procédures de lyse et de purification. Parmi les différentes méthodes publiées pour lyser les parois des mycobactéries, la lyse enzymatique avec du lysozyme et de la protéinase K (3), et/ou les méthodes physiques tel que le broyage avec des billes (10) sont souvent employées. Concernant la purification de l'ADN, la procédure à l'hexadecyltriméthylammonium bromide-NaCl (CTAB-NaCl), intégrant un traitement final au phénol-chloroforme- alcool isoamyl, est souvent appliquée sur les isolats de mycobactéries et sur les échantillons cliniques (1). Récemment plusieurs études utilisent des procédures basées sur la technique inhibitor removal technology® (IRT) pour purifier l'ADN des échantillons de l'environnement (14). Cependant peu d'études se sont focalisées sur l'efficacité de l'extraction de l'ADN mycobactérien et sur sa qualité en particulier pour les échantillons de l'environnement.

Des échantillons d'eau de surface (6 réplicats) ont été collectés dans la Seine entre juillet 2008 et mars 2009, près d'Orly. Pour chaque réplicat, 1 litre a été concentré par centrifugation (7000×g, 15min, 4°C) dans 9 ml. Ces concentrats ont été enrichis avec 1 ml d'une suspension de la souche *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752 contenant 10⁶ cellules. Ensuite les concentrats inoculés ont été centrifugés pour extraire l'ADN de la biomasse microbienne. Six combinaisons de procédures de lyse et purification ont été comparées (A+C, B+C, A+B+C, A+D, B+D, A+B+D).

- Méthode A : digestion lysozyme (1mg/ml) pendant 1h à 37°C, puis digestion avec protéinase K (0,2 mg/ml) et SDS (1,2%) pendant 10 min à 65°C
- Méthode B : cassure par agitation avec des billes de verre à l'aide du kit Power Soil (MoBio)
- Méthode C : incubation 10 min à 65°C avec une solution de CTAB (0,8 M) et 0,6% NaCl, suivi de 4 étapes de purification phénol:chloroforme:alcool isoamyl (25:24:1)
- Méthode D : IRT suivant le protocole du kit Power Soil (MoBio).

La concentration et la pureté des ADN totaux extraits ont été estimées par mesure d'absorbance à 260 nm et 280 nm. La concentration en ADN mycobactérien a été estimée par PCR en temps réel selon la méthode que nous avons développée ((12), rapport PIREN 2009). La quantité d'ADN a été exprimée en équivalent génome sur la base de la taille du génome de *M. chelonae* qui contient une copie du gène *rrs* codant l'ARNr 16S.

Tableau 1. Pureté et quantité des ADN totaux extraits par six méthodes sur six réplicats (moyenne et écart-type) d'échantillons d'eau de surface de la Seine. Entre parenthèse est indiqué le nombre de réplicats quantifiables

Méthode d'extraction	Log ₁₀ de copies de génome de MNT	ADN total extrait	
		A _{260/280}	ADN µg/ml
A+C	4.88±0.74 (6)	1.88±0.19 (6)	318±228 (6)
A+D	ND	2.66 (1)	20 (1)
B+C	ND	1.91±0.15 (6)	84±44 (6)
B+D	4.02±0.77 (2)	1.77±0.04 (6)	101±41 (6)
A+B+C	3.16±0.34 (6)	0.74 (1)	123 (1)
A+B+D	ND	1.45±0.28 (5)	14±8 (5)

Les six méthodes d'extraction ont été comparées sur la base la quantité et de la qualité d'ADN extrait et sur la base de la répétabilité de l'extraction. La méthode A+C, combinant la lyse enzymatique avec la procédure de purification CTAB-NaCl, est apparue la plus appropriée avec la quantité d'ADN total significativement la plus élevée dans les 6 réplicats (Wilcoxon, n=36, ddl=5, p<0,01) et la pureté de l'ADN total la plus élevée (un rapport A260/280 proche de 2 indique une pureté élevée) permettant l'amplification en temps réel (Tableau 1). Cependant il est à noter une grande variabilité dans l'efficacité de l'extraction (Tableau 1).

Concernant la quantité d'ADN mycobactérien estimée par PCR en temps réel, les méthodes A+C et A+B+C ont permis de récupérer les quantités les plus élevées d'ADN mycobactérien dans les six réplicats (Tableau 2). Nos résultats sont en accord avec ceux de Mitchell et Takacs-Vesbach (6) qui recommandent la procédure CTAB-NaCl en comparaison avec un kit d'extraction (méthode IRT) pour étudier les communautés bactériennes dans l'environnement. O'Mahony et Colin (8) ont également utilisé avec succès la méthode CTAB-NaCl pour détecter *M. avium* subsp. *paratuberculosis* par PCR en temps réel dans des échantillons environnementaux. Cependant la méthode d'extraction A+C n'est pas totalement efficace, car le nombre de copie de génomes estimé par litre d'eau (4.88Log₁₀, tableau 2) est plus faible que le nombre de mycobactéries estimé par culture (6.29log₁₀ UFC±0.04 par litre d'eau). La méthode A+C présente donc un taux de récupération de l'ADN de 1 à 33% seulement. Néanmoins nous avons décidé de retenir cette méthode pour quantifier les MNT dans les eaux et les sols, du fait qu'il n'existe pas de meilleure méthode dans la littérature.

Facteurs conditionnant les densités de mycobactéries dans les sols

Les mycobactéries peuvent être isolées ou détectées dans différents types de sols considérés comme des habitats naturels des MNT. Néanmoins les études précédentes se sont focalisées sur les sols ruraux ou urbains, mais aucune comparaison des deux types de sols n'avait été entreprise. Selon la littérature, les sols riches en acides humiques et fulviques et les sols riches en hydrocarbures aromatiques polycycliques semblent être favorables à la croissance des mycobactéries (4). Par conséquent notre objectif a été de comparer les densités de mycobactéries dans différents types de sols d'origines rurales et urbaines afin de déterminer lesquels présentaient les plus fortes densités en MNT.

Tous les sols étudiés ont été échantillonnés dans les premiers 10 cm, en temps sec. Quatre types de sol de sept régions géographiques en Virginie (USA), en Floride (USA) et en région parisienne ont été collectés. L'ADN a été extrait par la méthode décrite au paragraphe précédent. Les quantités de MNT ont été estimées par PCR en temps réel selon la méthode que nous avons développée (12, rapport PIREN 2009). La couleur des sols a été évaluée en utilisant le système Munsell, l'humidité a été évaluée par perte de poids après une nuit à 105°C. La teneur en carbone a été mesurée via un analyseur de chez Elementar Analysen systeme GmbH. La conductivité électrique et le pH ont été évalués en suivant les normes ISO 11265: 1994 et ISO 10390: 2004. Les métaux ont été mesurés ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry, Varian Vista Pro CCD).

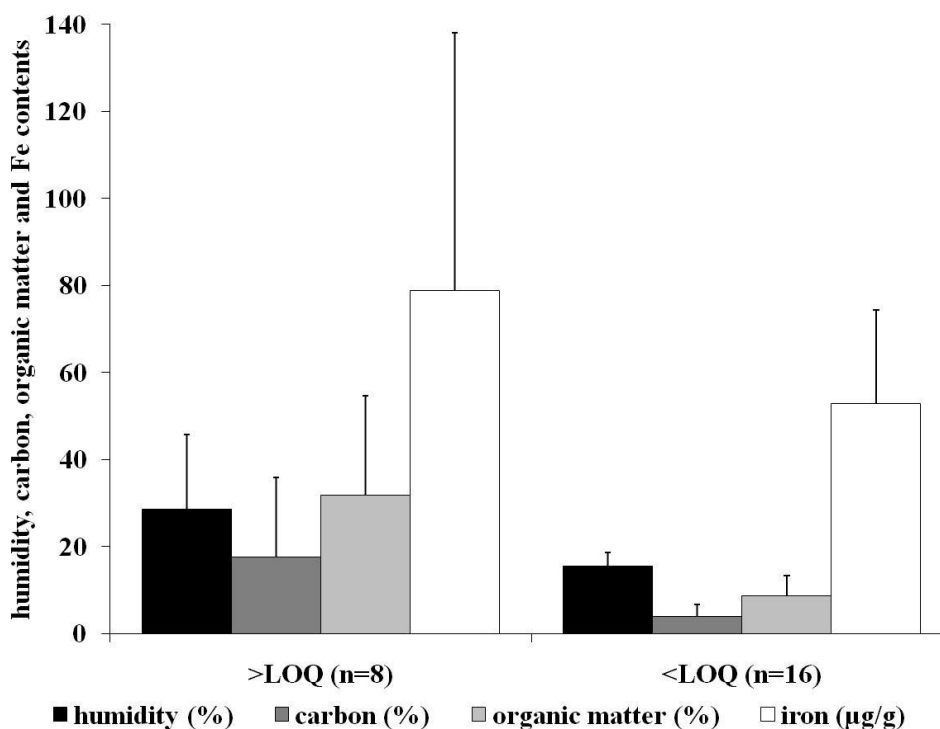


Figure 1. Facteurs expliquant significativement les densités de mycobactéries dans les sols (n=24) de forêt tourbeuse et les sols côtiers faiblement urbanisés (>Limite de quantification, LOQ), et dans les sols de forêts urbaines, pâtures, parcelles cultivées, espaces verts en zones faiblement et fortement urbanisées (<LOQ). Tous les résultats sont en poids sec.

Les densités de MNT les plus importantes ont été mesurées dans des sols de forêts tourbeuses ($6,95 \times 10^4 \pm 6,18 \times 10^4$ copies/g sec) et dans des sols urbains faiblement urbanisés proches de marécages côtiers ($1,28 \times 10^6 \pm 2,48 \times 10^6$ copies/g sec). L'occurrence de 19% des MNT dans des sols est en accord avec des études précédentes qui estimaient par mise en culture cette occurrence à 18% dans des sols faiblement urbanisés et 16% dans des pâtures (7, 13). Par contre aucune MNT n'a été détectée (<250 copies) dans les autres types de sols étudiés : forêt urbaine, pâture, parcelles cultivées, espaces verts en zones faiblement et fortement urbanisées. Cependant la faible efficacité de l'extraction de l'ADN de notre méthode pourrait conduire à une sous-estimation des densités de MNT dans les sols. Nos résultats montrent cependant que des densités élevées de MNT ne sont pas seulement trouvées dans les sols acides mais également dans des sols à pH neutre. Une autre étude a également montré que des MNT peuvent être détectées dans une large gamme

de pH (5), par conséquent les MNT devraient être considérées comme des bactéries ubiquistes dont l'habitat préférentiel serait les environnements à pH acide. En effet, la densité de MNT a été significativement (GLM, n=24, p<0,01) associée à des sols présentant des valeurs faibles de pH et des teneurs fortes en humidité, matière organique et fer (figure 1). Ces résultats suggéreraient que la production intra et extracellulaire de chélateurs de fer chez les MNT est limitée par la concentration en fer dans l'environnement, ce qui influencerait sur leur croissance.

3 Impact du ruissellement sur la quantité des mycobactéries dans l'eau de surface en zones urbaines, péri-urbaines et rurales pendant des épisodes pluvieux

Tout comme pour les sols, la littérature décrit la présence de MNT dans l'eau de différentes origines sans comparer ces dernières entre elles. De plus certaines données nous indiquent que la présence de MNT dans les eaux de surface est significativement plus élevée à la suite d'événements pluvieux consécutifs et dans les eaux riches en matière organique (9). Ceci suggère que les mycobactéries des sols peuvent être amenées par le lessivage des sols et les rejets urbains de temps de pluie dans les eaux de surface (2). Cependant le comportement des mycobactéries dans les eaux de surface n'ajamais été étudié ni dans les zones urbaines, ni durant les évènements pluvieux. Afin d'étudier indirectement l'impact de l'eau du ruissellement, nous avons mesuré en temps sec et au cours d'un événement pluvieux la densité des MNT dans l'eau de surface de la Marne et de ces affluents majeurs qui traversent des zones urbaines, péri-urbaines et rurales.

Nous avons échantillonné une section de la Marne en temps sec le 18 septembre 2009, et durant un évènement pluvieux les 5 et 6 octobre 2009. Trois affluents (La Beuvronne, Le Morbras et la Gondoire), ainsi que l'amont et l'aval de leur confluence ont été échantillonnés, soit 1 litre d'eau de surface (premier mètre) prélevé au seau (n=48). Environ à la même heure, chaque point a été prélevé 6 fois avant, durant et après la pluie jusqu'à ce que le débit des affluents revienne à son état normal. Les ADN ont été extraits selon la méthode décrite précédemment et les mycobactéries ont été mesurées par PCR en temps réel selon la méthode que nous avons développée ((12), rapport PIREN 2009). L'oxygène dissous, le pH et la conductivité ont été mesurés *in situ* à l'aide de sondes (WTW). La turbidité a été mesurée *in situ* à l'aide d'un turbidimètre 2100P (Hach). Les données de pluviométrie ont été mesurées par l'office météorologique de Paris-Montsouris.

Tableau 2. Densité des mycobactéries dans les eaux de surface de la Marne et de ses affluents. Le nombre d'échantillons positifs sur le nombre d'échantillons testés est indiqué entre parenthèse, l'heure de détection est exprimée en heure décimale après le début de la pluie.

Début de la pluie	Densité des mycobactéries log ₁₀ copy/L ± SD		
	Amont de l'affluent	Affluent	Aval de l'affluent
	Trilbardou	Beuvronne	Chalifert
temps sec	5,22 (1/1)	ND (0/1)	ND (0/1)
temps de pluie	4.99 ± 0.36 (3/5)	ND (0/5)	ND (0/5)
Heure de détection	4.2-11.8	ND (0/5)	ND (0/5)
	Chalifert	Gondoire	Gournay
temps sec	ND (0/1)	5,20 (1/1)	ND (0/1)
temps de pluie	ND (5/6)	ND (5/6)	5,10 ± 0,08 (2/5)
Heure de détection	N/A	N/A	7.0-11.2
	Champigny	Morbras	Charentonneau
temps sec	ND (0/1)	5,54 (1/1)	5,92 (1/1)
temps de pluie	ND (5/6)	ND (5/6)	4,58 (1/5)
Heure de détection	N/A	N/A	13.3

Les densités mycobactériennes dans les zones rurale, péri-urbaine et urbaine, qui ont été estimées à $2,16 \times 10^5 \pm 2,36 \times 10^5$ copies/L dans 20,8% des échantillons de temps sec (Tableau 2), décroissent sous le niveau de quantification au cours de l'évènement pluvieux. Cette pluie a d'ailleurs présenté une faible intensité (6,6 mm/h de pluie cumulée pendant 5,5 h). Les densités de MNT sont significativement expliquées par la pluviométrie cumulée (GLM, n=48, p < 0,01) et par la durée de la pluie (GLM, n=48, p = 0,01), mais pas par la turbidité. Les eaux de la Gondoire et celles du Morbras ont montré des concentrations élevées en mycobactéries en temps sec, de même pour l'amont de la confluence avec la Beuvronne (Tableau 2). Malgré l'apport de MNT par le ruissellement sur les surfaces urbaines et péri-urbaines, un phénomène de dilution au cours de la pluie a conduit à une diminution des densités de MNT en-dessous de la limite de quantification après 7 à 13 h de pluie suivant le site. Par ailleurs il semblerait qu'il existe des sources encore non-identifiées de MNT sur la Marne, notamment en aval du Morbras et de la Gondoire, et en amont de la Beuvronne. Ces résultats montrent néanmoins qu'un évènement pluvieux long et de faible intensité diminue les densités de MNT dans les eaux de surface, alors que la littérature indique que les évènements pluvieux intenses favorisent l'augmentation des densités mycobactériennes dans les eaux de surface (2). Nos résultats mettent donc en évidence l'importance de l'hydrologie et de l'occupation des sols pour comprendre l'écologie des MNT.

4 Conclusions et perspectives

• Quantification des mycobactéries non-tuberculeuses dans l'environnement

Le développement d'une nouvelle technique de PCR temps réel (12) et l'optimisation des techniques d'extraction de l'ADN mycobactérien, nous offre désormais des outils performants pour quantifier les MNT dans les environnements aquatiques et terrestres. Cependant, il est à noter que les densités de MNT mesurées sont sous-estimées dans les études utilisant ce protocole, car la méthode d'extraction d'ADN s'avère l'étape limitante (<33% d'efficacité d'extraction de l'ADN). Par ailleurs, notre méthode de quantification par PCR en temps réel ne permet pas la détection de certaines espèces de MNT comme *M. arupense*, *M. gadium*, *M. lentiflavum*, *M. nonchromogenicum*, *M. psychrotolerans*, *M. szulgai* et *M. tusciae*. Des améliorations, tant sur le plan de l'extraction que sur la sensibilité de la méthode PCR, restent à entreprendre. Néanmoins, la méthode de quantification moléculaire proposée est pour l'instant le seul outil à disposition, d'autant que sa spécificité de 100 % est cruciale pour des échantillons de l'environnement qui sont riches en bacilles acido-alcool résistants autres que les MNT et conduiraient à des surestimations des quantités de MNT s'ils étaient amplifiés.

• Sources diffuses de mycobactéries non-tuberculeuses dans les bassins versants

Concernant l'étude sur l'impact du ruissellement, la nature du sol ainsi qu'un phénomène de dilution lors de l'évènement pluvieux semblent affecter les densités de MNT dans les eaux de surface. Les sols forestiers et marécageux sembleraient être propices au développement des MNT et c'est en ce sens qu'ils pourraient être considérés comme des habitats naturels de MNT présentant des pH faibles, une forte humidité, des teneurs importantes en matière organique et fer. Lors d'évènements pluvieux, les sols ruraux avec de l'élevage ou bien des sols forestiers et marécageux peuvent impacter les eaux de surface via le ruissellement. Toutefois, nous avons démontré des apports à la fois de zones rurales et forestières, ainsi que des apports d'un affluent (le Morbras) qui est globalement de mauvaise qualité écologique et microbiologique, essentiellement impacté par des rejets urbains de temps de pluie. En temps de pluie, les ruissellements des zones péri-urbaines et rurales ne semblent pas augmenter la densité de MNT dans l'eau de surface en raison d'un phénomène de dilution évoqué. Ces études constituent une première approche, qui demanderait à être confirmée par des campagnes supplémentaires lors de plusieurs évènements pluvieux intenses, et par l'échantillonnage d'eaux de ruissellement provenant de sols naturellement riches en mycobactéries afin de valider ces hypothèses.

5 Références

- 1- Amaro, A., Duarte, E., Amado, A., Ferronha, H., Botelho, A., 2008. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 8-11.
- 2- Iivanainen, E. K., P. J. Martikainen, P. K. Vaananen, and M. L. Katila. 1993. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:398-404.
- 3- Käser, M., Ruf, M.T., Hauser, J., Marsollier, L., Pluschke, G., 2009. Optimized method for preparation of DNA from pathogenic and environmental mycobacteria. 75. 2.
- 4- Kirschner, R. A., B. C. Parker, and J. O. Falkinham. 1999. Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:327-332
- 5- Leys, N. M., A. Ryngaert, L. Bastiaens, P. Wattiau, E. M. Top, W. Verstraete, and D. Springael. 2005. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:375-388.
- 6- Mitchell, K.R., Takacs-Vesbach, C.D., 2008. A comparison of methods for total community DNA preservation and extraction from various thermal environments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1139–1147.
- 7- Norby, B., G. T. Fosgate, E. J. B. Manning, M. T. Collins, and A. J. Roussel. 2007. Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: Association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. *Veterinary Microbiology* 224:153-159.
- 8- O'Mahony, J., Colin, H., 2002. A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler *J. Microbiol. Methods.* 51, 283-293
- 9- Pickup, R. W., G. Rhodes, J. Bull, S. Arnott, K. Sidi-Boumedine, M. Hurley, and J. Hermon-Taylor. 2006. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: Diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4067-4077
- 10- Pickup, R.W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T.J., Weightman, A., Hurley, M., Hermon-Taylor, J., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and Its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2130-2139.
- 11- Radomski, N., Cambau, E., Moulin, L., Haenn, S., Moilleron, R., Lucas, F.S., 2010a. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3514–3520.
- 12- Radomski, N., Lucas, F.S., Moilleron, R., Cambau, E., Haenn, S., Moulin, L., 2010b. Quantification of *Mycobacterium* genus in surface water by real time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7348-7351
- 13- Rahbar, M., A. Lamei, H. Babazadeh, and S. A. Yavari. 2010. Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in Iran. *African Journal of Biotechnology* 9:3618-3621.
- 14- Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, J., Kopecky, J., 2008. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2902-2907.