

**SOUTENANCE DE THÈSE**  
**Doctorat en Sciences et Techniques de l'Environnement**

**ÉCOLE DOCTORALE**  
Sciences, Ingénierie et Environnement

UNIVERSITÉ —  
— **PARIS-EST**

Page | 1

Monsieur RADOMSKI Nicolas

**« Sources des mycobactéries non-tuberculeuses dans les bassins versants »**

**« Sources of nontuberculous mycobacteria in watersheds »**

le 28 février 2011

de 14h00 à 17h00 en amphitheâtre Navier

École des Ponts ParisTech, 6-8 avenue Blaise Pascal, Cité Descartes,

77420 Champs-sur-Marne



Directeur de thèse : Pr. Régis MOILLERON

Co-encadrante de thèse : Dr. Françoise LUCAS

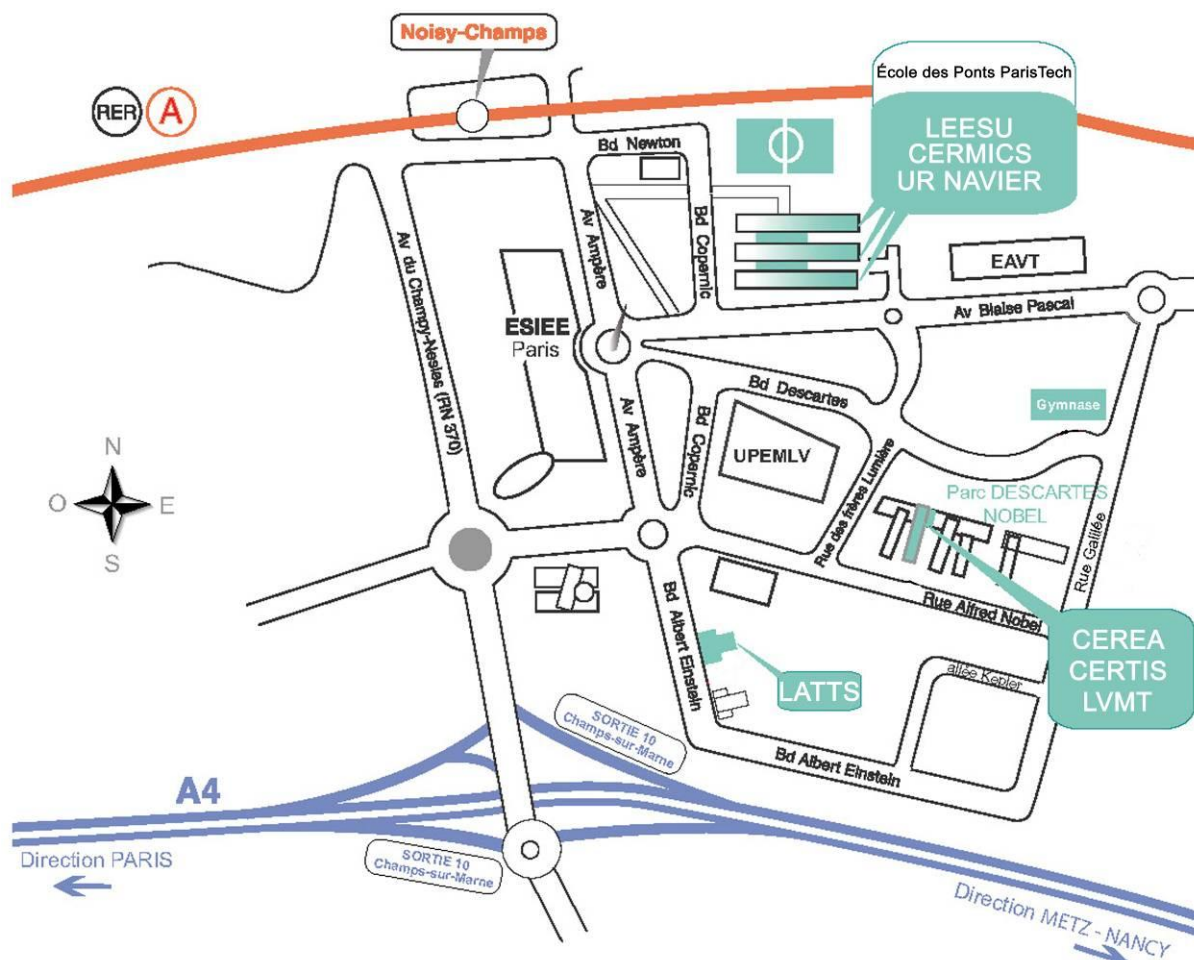
Laboratoire Eau Environnement Systèmes Urbains



Composition du jury :

Pr. Benoit COURNOYER	Rapporteur	Directeur de recherche au CNRS
Pr. Christophe SOLA	Rapporteur	Université Paris Sud
Pr. Emmanuelle CAMBAU	Examineur	Groupe Hospitalier Lariboisière-Fernand Widal
Pr. Joseph O. FALKINHAM III	Examineur	Virginia Polytechnic Institute
Pr. Daniel THÉVENOT	Examineur	Université Paris-Est Créteil
Dr. Laurent MOULIN	Examineur	Eau de Paris
Dr. Vincent ROCHER	Invité	Service Public de l'Assainissement Francilien

**AVIS DE SOUTENANCE DE THÈSE**  
**NOTICE OF Ph.D. DEFENCE**



#### En RER A

- Ligne A, station Noisy - Champs, sortie 3 - Cité Descartes.
- L'École des Ponts ParisTech est à 25 minutes du centre de Paris et à 20 minutes de la gare TGV de Chessy.

#### Par l'autoroute A4

- En venant de Paris, autoroute A4, direction Metz - Nancy, sortie Champs-sur-Marne, direction Cité Descartes. L'École des Ponts ParisTech est à 15 km de la porte de Bercy.
- En venant de la province, autoroute A4, direction Paris, sortie Marne-la-Vallée - Val Maubuée centre, direction Marne-la-Vallée - Cité Descartes.

#### Par le bus

- Bus 213 : ligne Gare SNCF Chelles-Gournay / Lognes-le-village, arrêt CROUS.
- Bus 212 : ligne Pointe de Champs / Gare SNCF Emerainville, arrêt CROUS.

#### Horaires d'ouverture

- services administratifs ouverts de 9h à 12h et de 14h à 17h.
  - accès libre à l'École, du lundi au vendredi, de 7h30 à 19h30.
  - bibliothèque ouverte, d'octobre à juin, du lundi au jeudi de 9h à 19h, le vendredi de 9h à 17h.
- En septembre et juillet, du lundi au vendredi de 9h à 17h.

#### By RER (the Paris suburban railway system)

- Line A, to Noisy - Champs station, exit 3 - Cité Descartes.
- The École des Ponts ParisTech is 25 minutes from the centre of Paris and 20 minutes from the TGV railway station of Chessy.

#### By the A4 motorway

- Coming from Paris, take the A4 motorway, direction Metz - Nancy, exit Champs-sur-Marne, direction Cité Descartes. The École des Ponts ParisTech is 15 km from the Porte de Bercy.
- Coming from outside Paris, take the A4 motorway, direction Paris, exit Marne-la-Vallée - Val Maubuée centre, direction Marne-la-Vallée - Cité Descartes.

#### By bus

- Bus 213 : Gare SNCF Chelles-Gournay / Lognes-le-village line, get off at CROUS bus stop.
- Bus 212 : Pointe de Champs / Gare SNCF Emerainville line, get off at CROUS bus stop.

#### Opening hours

- Offices hours : 9.00 am to 12.00 pm and 2.00 pm to 5.00 pm.
- Unrestricted access Monday to Friday, from 7.30 am to 7.30 pm.
- Library open, from October to June, from Monday to Thursday from 9.00 am to 7.00 pm, on Friday from 9.00 am to 5.00 pm. In September and July, from Monday to Friday from 9.00 am to 5.00 pm.

L'eau et le sol sont considérés comme des sources potentielles de mycobactéries non-tuberculeuses (MNT). Parmi les infections humaines causées par les MNT d'origine environnementale, les infections pulmonaires et cutanées sont souvent décrites. Le manque de connaissances sur leur cycle de vie dans l'environnement requiert des outils analytiques, qui ne sont actuellement pas adaptés à ce type d'échantillons. Cette thèse vise donc premièrement à proposer des méthodes de quantification en bactériologie et en biologie moléculaire dans le but de déterminer les sources des MNT dans les bassins versants. Ainsi, la comparaison des méthodes d'isolement de MNT a montré que le traitement au chlorure de cetylpyridinium de l'eau suivi d'une culture en milieu riche supplémenté par un mélange d'antibiotiques (polymyxine B, amphotéricine, acide nalidixique, triméthoprime, carboxy-pénicilline) limitait la croissance des microorganismes interférents et éliminait moins de MNT que les autres méthodes comparées (Radomski *et al.* 2010, doi: 10.1128/AEM.00942-10). Bien que des espèces de MNT potentiellement pathogènes aient été isolées de l'eau de surface de la Seine en utilisant ces outils bactériologiques, la quantification des MNT ne s'est pas avérée reproductible. En conséquence, une méthode de quantification par polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR) a été développée pour énumérer le genre *Mycobacterium* dans l'eau (Radomski *et al.* 2010, doi: 10.1128/AEM.02659-09). La nouvelle méthode développée, ciblant l'ARNr 16S, était plus spécifique que les autres méthodes qPCR publiées, ciblant un autre *locus* de l'ARNr 16S et le gène *hsp65* (respectivement 100 % *versus* 44 % et 91 %). La comparaison des méthodes d'extraction d'ADN mycobactérien a montré que la lyse enzymatique combinée au bromure d'hexadécyltriméthylammonium était la procédure la plus efficace pour énumérer par qPCR les MNT dans des échantillons environnementaux. Ainsi, ces méthodes d'extraction d'ADN et de qPCR ont été utilisées pour étudier des sources de MNT dans des bassins versants.

Dans un second temps, nous avons étudié trois sources potentielles de MNT : une ponctuelle et deux diffuses. Plus précisément, une station d'épuration (STEP) a été choisie comme source ponctuelle de MNT et a été étudiée en temps sec en fonction d'indicateurs de contamination fécale et des paramètres globaux habituellement contrôlés. Les MNT ont atteint  $5,52 \times 10^5 \pm 3,97 \times 10^5$  copies/L dans l'eau en entrée de STEP (84 % d'échantillons positifs), n'ont pas été détectées dans l'eau en sortie de STEP après décantation physico-chimique et biofiltration et ont été estimées à  $1,04 \times 10^6 \pm 1,75 \times 10^6$  copies/g dans les boues de STEP (50 % d'échantillons positifs). La plupart des MNT (98±2 %, correspondant à  $2,45 \pm 0,78 \log_{10}$ ) ont été éliminées par décantation physico-chimique et les MNT restantes ( $0,74 \times 10^4 \pm 1,40 \times 10^4$  copies/L) ont été éliminées par biofiltration (53 % d'échantillons positifs). Ces résultats ont montré également que *Mycobacterium*, *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux possèdent des comportements significativement différents conduisant respectivement à trois modèles : hydrophobe, hydrophile et intermédiaire.

Concernant les sources diffuses, la densité de MNT a été mesurée dans divers sols ruraux et urbains qui ont été caractérisés par différents paramètres physico-chimiques. Les densités de MNT les plus importantes ont été mesurées dans des sols de forêts tourbeuses ( $9,27 \times 10^4 \pm 5,00 \times 10^4$  copies/g sec) et dans des sols faiblement urbanisés proches de marécages côtiers ( $1,71 \times 10^6 \pm 2,85 \times 10^6$  copies/g sec) alors qu'aucune MNT n'a été détectée dans les autres types de sols étudiés. De plus, la densité de MNT a été significativement associée à des sols

proches de zones acides et des teneurs fortes des sols en eau, matière organique et fer. Ces résultats suggéreraient que les MNT sont dépendantes de leur production intra et extracellulaire de chélateurs de fer et indiqueraient que les zones faiblement urbanisées pourraient être impactées par la proximité de marais acides. Afin d'étudier une autre source diffuse, les MNT et d'autres paramètres ont été mesurés lors d'événements pluvieux dans l'eau de surface de la Marne et de ses principaux affluents. Les densités de MNT ont été estimées à  $2,16 \times 10^5 \pm 2,36 \times 10^5$  copies/L dans environ 20 % des échantillons d'eau collectés, et elles ne différaient pas entre les zones péri-urbaines et rurales échantillonnées. Nos résultats ont montré que la pluviométrie et la durée de l'évènement expliquaient la diminution du nombre de MNT détectées dans l'eau de surface au cours de l'évènement pluvieux de faible intensité (6,6 mm/h de pluviométrie cumulées en 5,5 h). Ces résultats ont souligné que certains affluents de la Marne pouvaient apporter des MNT en temps sec, mais qu'au cours de l'évènement pluvieux suivi les densités de MNT diminuaient.

En guise d'amélioration à ces études appliquées, des réflexions sur les défis relatifs à la surveillance des microorganismes pathogènes dans l'environnement ont été explorées. En nous focalisant sur la MNT la plus pathogène, *M. avium*, nous avons discuté des défis de la détection et de l'énumération et proposé un guide d'adaptation des méthodes médicales aux échantillons environnementaux (Radomski *et al.* 2011, ed. A. Méndez-Vilas, Vol. 2). Ce guide se présente sous la forme d'un arbre de décision permettant de choisir les outils analytiques les plus appropriés pour surveiller les microorganismes pathogènes dans l'environnement. De plus, une stratégie *in silico* de comparaison de génomes bactériens totalement séquencés a été développée dans le but de décrire des nouvelles cibles de détection. L'analyse *in silico* des génomes totalement séquencés a permis de détecter 11 protéines présentant entre 80 % et 100 % de similarité dans les génomes mycobactériens et moins de 50 % de similarité dans les génomes non-mycobactériens des genres *Corynebacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*. Sur la base d'alignements des séquences d'ADN de ces cibles potentielles, il a été possible de dessiner des amorces PCR et une sonde pour détecter le gène codant la sous-unité C de la synthase de l'adénosine triphosphate qui semble exclusivement conservée dans le génome mycobactérien.

Le développement d'outils analytiques, en particulier la qPCR, a permis de montrer qu'une STEP éliminait efficacement les MNT et que le traitement des eaux usées est nécessaire pour préserver l'eau de surface de cette source ponctuelle de MNT. Il a été mis en évidence que les événements pluvieux diminuent la densité de MNT dans l'eau de surface et que les sols acides sont des sources naturelles majeures de MNT qui pourraient impacter des zones faiblement urbanisées en temps de pluie via le ruissellement. Concernant les réflexions sur la surveillance des microorganismes pathogènes dans l'environnement, l'arbre de décision des outils analytiques appropriés et la nouvelle stratégie *in silico* de détection de cibles moléculaires pourraient être appliqués pour l'étude d'autres microorganismes de l'environnement.

**Mots clefs :** mycobactéries, mycobactériologie, pathogène émergent, environnement, bassin versant, eau, sol, sources diffuses, sources ponctuelles, ADN, qPCR, séquençage, détection moléculaire, bioinformatique, amorces, sondes.

Water and soil are considered as potential sources of nontuberculous mycobacteria (NTM) infections. Among human infections caused by environmental NTM, pulmonary infections and cutaneous infections are often described. However, lack of knowledge about their life cycle in the environment requires analytical tools, which are not currently adapted to these kinds of samples. The aim of this thesis is to propose bacteriological and molecular quantitative methods, in order to determine the sources of NTM in watersheds. Comparison of NTM isolation methods showed that treatment with cetylpyridinium chloride of water, followed by culture on a rich medium supplemented with antibiotic cocktail (polymyxin B, amphotericin, nalidixic acid, de trimethoprim, azlocillin) decreased the growth of nontarget microorganisms, while inhibiting less NTM than the other compared methods (Radomski *et al.* 2010 doi: 10.1128/AEM.00942-10). Although potentially pathogenic NTM species were isolated from surface water of the Seine River using these bacteriological tools, enumeration of NTM was not reproducible. Consequently, a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) method was developed in order to enumerate *Mycobacterium* spp. in water (Radomski *et al.* 2010 doi: 10.1128/AEM.02659-09). This newly developed method, targeting 16S rRNA, was more specific than the two previously published qPCR methods targeting another 16S rRNA locus and the *hsp65* gene (100% versus 44% and 91%, respectively). Comparison of DNA extraction methods showed that the enzymatic lysis and hexadecyltrimethylammonium bromide procedure was the most effective combination for mycobacterial DNA extraction with the aim to enumerate NTM in environmental samples by qPCR. Thus, these extraction and qPCR methods were used in order to study NTM sources in watersheds.

Secondly, we studied three potential sources of NTM: one point source and two nonpoint sources. More precisely, a wastewater treatment plant (WWTP) was chosen as a potential point source of NTM and was studied according to indicators of fecal contamination and usually monitored parameters. NTM reached  $5.52 \times 10^5 \pm 3.97 \times 10^5$  copies/L in the influent of WWTP (84% of positive samples). They were not detected in the effluent after physico-chemical decantation and biofiltration, and were estimated at  $1.04 \times 10^6 \pm 1.75 \times 10^6$  copies/g in sludge (50% of positive samples). Most NTM (98±2%, i.e.  $2.45 \pm 0.78 \log_{10}$ ) were removed by the physical-chemical decantation, and the remaining NTM ( $0.74 \times 10^4 \pm 1.40 \times 10^4$  copies/L) were removed by biofiltration (53% of positive samples). These results showed also that *Mycobacterium*, *Escherichia coli* and intestinal enterococci follow significantly different behaviors as hydrophobic, hydrophilic and intermediate models, respectively.

Concerning the nonpoint sources, NTM were enumerated in a variety of rural and urban soils which were characterized by different physico-chemical parameters. The highest NTM densities were measured in peat forest soils ( $9.27 \times 10^4 \pm 5.00 \times 10^4$  copies/g dw) and in lightly urbanized soils near a costal swamp ( $1.71 \times 10^6 \pm 2.85 \times 10^6$  copies/g dw), whereas they were not detected in the other monitored soils. NTM density was significantly associated with soils near acidic areas and high moisture, organic matter, and iron content in soils. These results emphasized that NTM are dependent upon the production of surface and extracellular iron-binding compounds, and may mean that lightly urbanized area could be impacted by the proximity of the acidic swamp. In order to study another nonpoint source,

NTM and other parameters were measured during wet events in surface water of Marne River and their main effluents. NTM density was estimated at  $2.16 \times 10^5 \pm 2.36 \times 10^5$  copies/L in about 20% of surface water samples, and NTM densities did not differ among rural and peri-urban sampling areas. Our results showed that the pluviometry and rain duration explained the decrease of detected NTM abundances in surface water during a slightly intense wet event (6.6 mm/h of cumulated rain during 5.5 h). These results emphasized that some tributaries of the Marne River may constitute a source of NTM, however their influence on NTM density in surface water of the Marne River decreased during the slightly intense wet event.

In order to improve these applied studies, challenges dealing with pathogenic microorganism monitoring in environment were explored. Focusing on the most pathogenic NTM, *M. avium*, we discussed the challenges for detection and enumeration and proposed a guidance for the adaptation of clinical methods to environmental samples (Radomski *et al.* 2010 ed. A. Méndez-Vilas, Vol. 2). This guidance was proposed as a decision tree allowing to choose the most suitable analytical tools in order to monitor pathogenic microorganisms in environment. Moreover, an *in silico* strategy of whole sequenced bacterial genome comparison was developed in order to describe new targets for NTM detection. *In silico* analysis of whole sequenced genomes allowed to detect 11 proteins showing between 80% and 100% of similarity with mycobacterial genomes, and less than 50% of similarity with closely related genomes of *Corynebacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* genera. Based on the DNA sequence alignments of these potential targets, it was possible to design a primer pair and a probe in order to detect by PCR the gene coding for adenosine-5'-triphosphate synthase subunits C which seems exclusively conserved in mycobacterial genome.

Using the developed analytical tools, especially the qPCR, we showed that a WWTP removed efficiently NTM from the influent, and that waste water treatment is necessary in order to preserve surface water against this NTM point source. It was shown that storm events decrease NTM densities in surface water and in contrast that acidic soils are major NTM natural sources which may impact lightly urbanized areas during wet weather when runoff water suspends soil matter. Concerning challenges dealing with pathogenic microorganism monitoring in environment, the decision tree of suitable analytical tools and the new *in silico* strategy of molecular target detection might be also useful for the study of other environmental microorganisms.

**Key words:** mycobacteria, mycobacteriology, emerging pathogen, environment, watershed, water, soil, point sources, nonpoint sources, DNA, real-time polymerase chain reaction, sequencing, molecular detection, primers, probe, bioinformatic.